

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie
Medizinische Fakultät
Universität Rostock

(Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar)

Charakterisierung eines neuen Tiermodells zur Analyse der Autoimmunpankreatitis in der MRL/Mp-Maus



Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
vorgelegt von

Benjamin Lorch
aus Hagnau am Bodensee
Berlin, den 15.11 2011

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Vollmar, Universität Rostock
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Jaster, Universität Rostock
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Lerch, Universität Greifswald

Datum der Einreichung: 17. November 2011

Datum der Verteidigung: 18. April 2012

1 DAS INHALTSVERZEICHNIS

1	DAS INHALTSVERZEICHNIS	2
1.1.	GLOSSAR	5
2	ZUSAMMENFASSUNG	6
2.1	CHARAKTERISIERUNG EINES NEUEN TIERMODELLS ZUR ANALYSE DER AUTOIMMUNPANKREATITIS IN DER MRL/Mp-MAUS	6
2.2	CHARACTERISATION OF A NEW ANIMAL MODEL FOR THE ANALYSIS OF AUTOIMMUNE PANCREATITIS IN THE MRL/Mp-MOUSE	9
3	EINLEITUNG	11
3.1	HISTORIE	11
3.2	DAS PANKREAS	13
3.3	MIKROZIRKULATION DES PANKREAS	14
3.4	PANKREATITIS	15
3.4.1	<i>ALLGEMEINES</i>	15
3.4.2	<i>PATHOPHYSIOLOGIE DER AKUTEN PANKREATITIS</i>	18
3.4.3	<i>PATHOPHYSIOLOGIE DER CHRONISCHEN PANKREATITIS</i>	19
3.5	AUTOIMMUNPANKREATITIS	23
3.5.1	<i>DEFINITION</i>	23
3.5.2	<i>EPIDEMIOLOGIE</i>	23
3.5.3	<i>PATHOGENESE UND DIAGNOSTIK DER AIP</i>	24
3.5.3.1	Histopathologie der AIP	24
3.5.3.2	Klinisches Erscheinungsbild und systemische Manifestation der AIP	26
3.5.3.3	Bildgebung	27
3.5.3.4	IgG4 und weitere serologische Befunde der AIP	27
3.5.4	<i>DIAGNOSEKRITERIEN UND DIFFERENTIALDIAGNOSEN</i>	28
3.5.5	<i>THERAPIE UND PROGNOSE DER AIP</i>	31
4	ZIEL DER STUDIE	33

5	MATERIAL UND METHODIK	34
5.1	VERSUCHSTIERE	34
5.2	EXPERIMENTELLES MODEL	34
5.2.1	<i>MIKROZIRKULATIONSMODELL DES PANKREAS</i>	34
5.2.2	<i>ANÄSTHESIE</i>	35
5.2.3	<i>MIKROCHIRURGISCHE PRÄPARATION</i>	35
5.3	UNTERSUCHUNGSMETHODEN	36
5.3.1	<i>INTRAVITALE FLUORESZENZMIKROSKOPIE</i>	36
5.3.2	<i>MIKROHÄMODYNAMISCHES MONITORING</i>	38
5.3.2.1	Kapillare und postkapillare Blutzellfließgeschwindigkeit	39
5.3.2.2	Funktionelle kapillare Dichte	40
5.3.2.3	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	41
5.3.2.4	Apoptotische Parenchymschäden des Pankreas	43
5.3.3	<i>HÄMATOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN</i>	43
5.3.3.1	Postoperative Labordiagnostik	43
5.3.3.2	Repetitive Blutentnahme	44
5.3.4	<i>HISTOMORPHOLOGIE</i>	44
5.3.4.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung	44
5.3.4.2	Histologische Auswertung	45
5.3.5	<i>IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN</i>	45
5.3.6	<i>MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN</i>	46
5.4	EXPERIMENTELLES PROTOKOLL	48
5.4.1	<i>VERSUCHSGRUPPEN</i>	48
5.4.2	<i>VERSUCHSABLAUF</i>	49
5.5	STATISTIK	50
6.	ERGEBNISSE	51
6.1	MIKROVASKULÄRE PERFUSION DES PANKREAS	51
6.2	INFLAMMATION	53

6.2.1	<i>LEUKOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTION</i>	53
6.2.2	<i>FUNKTIONELLE KAPILLARE DICHTEN</i>	55
6.2.3	<i>KAPILLARE UND VENULÄRE BLUTZELLFLIESSGESCHWINDIGKEIT</i>	56
6.2.4	<i>APOPTOTISCHE ZELLSCHÄDEN</i>	58
6.3	HISTOPATHOLOGIE	58
6.3.1	<i>HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG</i>	58
6.3.2	<i>IMMUNHISTOLOGIE</i>	60
6.4	MOLEKULARBIOLOGIE	61
6.5	VOLLBLUT UND SERUMANALYTIK	62
6.5.1	<i>HÄMATOLOGISCHE PARAMETER</i>	62
6.5.2	<i>ELISA</i>	62
6.5.3	<i>REPETITIVE BLUTENTNAHME</i>	63
7	DISKUSSION	66
7.1	TIERMODELLE DER AIP	66
7.2	DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODIK	72
7.2.1	<i>MIKROZIRKULATIONSMODELLE</i>	72
7.2.2	<i>DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGSTECHNIKEN</i>	73
7.2.2.1	Präparationstechnik und Intravitalmikroskopie	73
7.2.2.2	Weitere Untersuchungstechniken	75
7.3	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	76
7.4	HYPOTHESEN ZUR PATHOGENESE DER AIP	84
7.5	KLINISCHE UND WISSENSCHAFTLICHE PERSPEKTIVEN	88
8	QUELLEN UND LITERATURANGABEN	89
I	DANKSAGUNG	
II	THESEN ZUR DISSERTATION	
III	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	

1.1 GLOSSAR

°C	Grad Celsius
μmol	Mikromol
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ANA	Antinukleäre Antikörper
AIP	Autoimmunpankreatitis
AP	Akute Pankreatitis
CHP	Chronische hereditäre Pankreatitis
CP	Chronische Pankreatitis
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
d	Tag
DBTC	Dibutylzinndichlorid
Da	Dalton
et al.	et alii; und andere
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKD	Funktionelle kapillare Dichte
g	Gramm
GPADH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
h	Stunden
Ig	Immunglobulin
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
l	Liter
ml	Milliliter
mmol	Millimol
p	statistisches Signifikanzniveau

PDGF	platelet derived growth factor
RBC	Erythrozyten
s	Sekunden
SEM	Standardabweichung
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEM	transendotheliale Migration
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TGF- β	Tissue-Growth-Factor- β
U	Enzymaktivität
V	Fließgeschwindigkeit
vs.	Versus
W	Watt
WBC	Leukozyten
z.B.	zum Beispiel

2 ZUSAMMENFASSUNG

2.1 CHARAKTERISIERUNG EINES NEUEN TIERMODELLS ZUR ANALYSE DER AUTOIMMUNPANKREATITIS IN DER MRL/Mp-MAUS

Seit einigen Jahren wird die Autoimmunpankreatitis (AIP) als neuartige eigenständige Entität der chronischen Pankreatitis angesehen. Pathogenese und Pathophysiologie dieses seltenen Krankheitsbildes sind bislang weitgehend unbekannt und es fehlt an adäquat charakterisierten Tiermodellen zur Untersuchung der Erkrankung. MRL/Mp-Mäuse entwickeln aufgrund ihres genetischen Hintergrundes spontan neben verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen auch eine Pankreatitis mit autoimmuner Charakteristik. Ziel der vorliegenden Studie war es, die AIP der MRL-Mp Maus anhand mikrozirkulatorischer, serologischer, histologischer und molekularbiologischer Parameter umfassend zu untersuchen und durch Korrelation der Parameter neue Einblicke in die autoimmunen Mechanismen der AIP zu gewinnen.

Insgesamt wurden 90 MRL/Mp-Mäuse beiden Geschlechts untersucht. Um die Pathogenese, den Zeitpunkt des Krankheitsbeginns und den Krankheitsverlauf der AIP in der MRL/Mp-Maus abzubilden, wurden die Tiere in vier verschiedene Altersgruppen (8-12 Wochen, 16-20 Wochen, 24-28 Wochen und 32-40 Wochen) eingeteilt. Allen Tieren wurde bis zum Erreichen des für die Untersuchung erforderlichen Alters repetitiv Blut entnommen. Zum Untersuchungszeitpunkt erfolgte unter Ketamin/Xylazin Narkose eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Nach Abschluss der *in vivo* Experimente erfolgte die Entnahme von Blut sowie die Pankreatektomie für die *ex vivo* durchgeführten histologischen, molekularbiologischen und serologischen Untersuchungen.

Die Analyse der Intravitalmikroskopie ergab eine alters- und geschlechtsabhängige Zunahme der Inflammation im Pankreasparenchym der MRL/Mp-Maus. In weiblichen Tieren kam es zu einer signifikanten intrapankreatischen Leukozyten-Akkumulation. Der Grad der Inflammation in männlichen Tieren war hingegen signifikant schwächer ausgeprägt und nicht altersabhängig. Des Weiteren konnte für Tiere, bei denen eine AIP diagnostiziert wurde, eine Störung der mikrovaskulären Perfusion des Pankreasparenchyms festgestellt werden. Für diese Tiere ergaben sich in der offline

Analyse der *in vivo* Versuche eine verringerte Blutzellfließgeschwindigkeit und eine Abnahme der funktionellen kapillaren Dichte.

Die histologische Untersuchung der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnittpräparate zeigte in allen Tieren der jüngsten Gruppe (8-12 Wochen) ein vollständig intaktes Pankreasparenchym. Bei keinem der Tiere konnte eine AIP diagnostiziert werden (durchschnittlicher histopathologischer Score 0 ± 0). In weiblichen Tieren der ältesten Gruppe (32-40 Wochen) zeigte sich hingegen eine massenhafte leukozytäre Infiltration, eine Rarefizierung und fettige Degeneration des Pankreasparenchyms (durchschnittlicher histopathologischer Score $1,5 \pm 0,3$). Weibliche Tiere im Alter von 24-40 Wochen zeigten eine AIP Inzidenz von 20-54%, wohingegen bei keinem männlichen Tier eine AIP diagnostiziert werden konnte. Insgesamt wurde eine signifikante Korrelation zwischen der *in vivo* festgestellten Inflammation und dem *ex vivo* diagnostizierten histopathologischen Score aufgezeigt, wobei die Inflammation der Parenchymschädigung zeitlich vorausgeht.

Immunhistochemisch konnten im Pankreasparenchym weiblicher Tiere im Alter von 32-40 Wochen signifikant höhere Werte für CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ und CD138⁺ Zellen als im Pankreasparenchym männlicher Tiere nachgewiesen werden. Molekularbiologisch wurde im Pankreasparenchym von weiblichen Tieren im Alter von 32-40 Wochen eine Hochregulation der Gene von INF- γ , IL-2 und IL-6 im Vergleich zu männlichen Tieren nachgewiesen.

Während im Blut junger Tiere (8-12 Wochen) keine Antinukleären Antikörper (ANA) nachzuweisen waren, konnte in älteren Tieren ANA nachgewiesen werden, wobei weibliche Tiere der ältesten Gruppe (32-40 Wochen) die höchsten Titer aufwiesen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen zum ersten Mal, dass es bei der AIP der MRL/Mp Maus analog zu anderen autoimmunen Erkrankungen zu einer frühen Hochregulierung des Immunsystems kommt. Diese Hochregulierung könnte determinierend für den Krankheitsbeginn sein. Die intravitalmikroskopisch nachgewiesene Störung der Mikrozirkulation, welche durch die Akkumulation von Leukozyten, die lokale Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Perfusionsabnahme bedingt ist, könnte den Krankheitsverlauf der AIP zusätzlich aggravieren.

2.2 CHARACTERISATION OF A NEW ANIMAL MODEL FOR THE ANALYSIS OF AUTOIMMUNE PANCREATITIS IN THE MRL/Mp-MOUSE

In recent years the autoimmune pancreatitis (AIP), a benign form of chronic pancreatitis, is getting recognized as a distinct entity. In the focus of etiology and pathogenesis, AIP is described as an enigma, lacking sufficient experimental *in vitro* and *in vivo* models for its distinct analysis. Due to their genetic background, MRL/Mp-mice are prone to develop several autoimmune diseases, including a pancreatitis with characteristics of autoimmune disease. The present study was undertaken to characterize the microcirculation, serological and histological parameters in AIP of MRL-Mp-mice and to gain new insights into the evolution of the immune response at different stages by correlating these parameters.

A total of 90 MRL/Mp-mice of either sex were analyzed for the study. To detect the pathogenesis, the onset and the course of the disease, animals were randomized into four different groups (8-12 weeks, 16-20 weeks, 24-28 weeks and 32-40 weeks). All animals received repetitive blood sampling until they reached the designated age for intravital microscopy. For intravital fluorescence microscopy of the pancreas, animals were anesthetized with ketamine/xylazine. At the end of the *in vivo* experiments blood and tissue samples have been preserved for further molecular biological and serological studies.

Intravital microscopic analysis of the pancreas showed an age- and sex-related increase of inflammation in the MRL/Mp-mice. Values of adherent leukocytes increased time dependently, with significantly elevated intrapancreatic leukocyte accumulation in females. Intrapaneatic inflammation in male animals was clearly less pronounced and did not depend on age. In animals with an apparent AIP there was a marked decrease of both red blood cell velocity and functional capillary density of the pancreatic parenchyma.

In the 8–12 week old animals hematoxylin-eosin stained paraffin sections of pancreatic tissue specimen showed an intact pancreatic morphology (histopathological score 0 ± 0). In old animals, and particularly in female mice, histological sections presented with rarefied pancreatic parenchyma, massive leukocytic infiltration and fatty degeneration (histopathological score $1,5 \pm 0,3$). In the group of 24–40 week old mice, female animals presented with an incidence of AIP between 20–54%, whereas

in male animals AIP could not be recognized at all. There was a significant correlation between the *in vivo* leukocyte adherence and the histological score, whereas the inflammation precedes the destruction of the tissue. To further characterize the inflammatory infiltration within the pancreatic tissue specimen, immunohistochemistry was performed. Pancreatic tissue of female animals within the age of 32–40 week revealed significantly increased CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ und CD138⁺ cells compared with male animals of the same age.

RNA-expression analysis of inflammation related cytokines in the group of 32–40-week old mice revealed that female animals expressed more INF- γ , IL-2 und IL-6 mRNA in the pancreatic tissue than male mice.

Young animals (8–12 week) did not present any detectable concentrations of antinuclear antibodies (ANA). In contrast, animals with the age of 24–28 week revealed increasing ANA. Especially female animals with the age of 32–40 week presented the highest values of ANAs.

The present comprehensive analysis provides *in vivo* evidence, that the late onset of AIP is likely triggered by an early rise of inflammation as seen in other autoimmune diseases. This early rise of inflammation may determine the onset of the disease. The observed disturbances of the microcirculation, which are caused by white blood cell accumulation and the upregulation of pro-inflammatory mediators, may enchain the process of tissue destruction.

3 EINLEITUNG

3.1 HISTORIE

Die wahrscheinlich erste Beschreibung des Pankreas als Organ findet sich im babylonischen Talmud, indem Rabbis von einem „Finger der Leber sprechen“. Die ersten anatomischen Beschreibungen finden sich um das dritte Jahrhundert vor Christus in Schriften der alten Griechen etwa bei Herophilus, Erasistratos, Eudemos und etwa um 100 nach Christus bei Galen. Die ungewöhnliche Beschaffenheit und die Beobachtung, dass das Organ weder Knochen noch Knorpel beinhaltet, führte Ruphus von Ephesus um 100 nach Christus zur Namensgebung „*Pankreas*“ (Griechisch pan = alles, + kreas = Fleisch) (Howard 2002). Die anfängliche Hypothese, dass es sich beim Pankreas um ein Schutzorgan handle, hatte lange Bestand. So schrieb der Anatom Andreas Vesalius (1513-1564) in seinem Werk „*De humani corporis fabrica*“, dass das Pankreas dem Schutz der von ihm ummantelten Venen und Arterien sowie des Magens diene. Im Jahre 1642 entdeckte der deutsche Johann Georg Wirsüng (1589-1643) den als Wirsüng Gang nach ihm benannten *Ductus pancreaticus*. Zu wissenschaftlichem Ruhm durch weitere anatomische Entdeckungen kamen Giovanni Domenico Santorini (1681-1737) durch den nach ihm benannten akzessorischen Pankreasgang, Abraham Vater (1684-1751) durch die Beschreibung der *Ampulla duodeni* sowie Ruggero Oddi durch die Entdeckung des nach ihm benannten Sphinkters im Jahr 1887. Trotz der genauen anatomischen Kenntnis des Pankreas gelang es lange Zeit nicht, die physiologische Funktion des Organs zu verstehen, bis Franciscus de le Boe Sylvius aus Amsterdam (1614-1672) die Hypothese eines mehrstufigen Verdauungssystems postulierte. Nachdem die Verdauung in Mund und Magen durch Speichelflüssigkeit beginne, erfolge die weitere Verdauung unter Beteiligung des Pankreas und ende mit abschließender Passage des Chylus in die Lymphe und ins venöse System (Kidd 1999). Regnier de Graaf, einem Schüler Sylvius, gelang die tierexperimentelle Gewinnung von pankreatischem Sekret aus Hunden. Da das von ihm als „*succus pancreaticus*“ bezeichnete Sekret jedoch mit Magensaft tingiert war, kam er zu der falschen Schlussfolgerung, dass das pankreatische Sekret sauer wäre. Die Theorie de Graafs wurde durch John Conrad Brunner (1653-1727) modifiziert. Durch Forschungen an von ihm pankreatomierten Hunden kam er zu dem Schluss, dass weniger das Sekret

des Pankreas, sondern vielmehr das Sekret der von ihm entdeckten und nach ihm benannten Drüsen entscheidend für die Verdauung seien. Ein genaueres Verständnis der physiologischen Funktion des Pankreas gelang aufgrund der komplexen anatomischen Lage sowie der komplizierten mikroskopischen Anatomie des Organs erst im 19. Jahrhundert (Pannala 2009).

Der deutsche Physiologe Willy Kuhne (1837-1900), als Entdecker des Trypsins, Alexander Marcet (1770-1822), als Entdecker der Lipase und Claude Bernard (1813-1878), der zeigte, dass Fett durch das Pankreassekret in Fettsäuren und Glycerin aufgespalten wird, trugen grundlegend zum Verständnis der Verdauung bei (Busnardo et al. 1983). Das von Ivan Pavloff (1849-1936) vorgelegte Konzept zur Regulation des Pankreas postulierte, dass die pankreatische Sekretion vagal gesteuert wird. Modifiziert wurde dieses Konzept 1902 durch William Bayliss (1860-1924) und Ernest Starling (1866-1927), die zeigen konnten, dass die Sekretion nicht nur ein vagaler Reflex ist, sondern auch durch einen chemischen Transmitter vermittelt wird, den sie als Sekretin bezeichneten und der sie zur Einführung des Begriffs „Hormon“ führte (aus dem Griechischen „hormonos“ = ich treibe an) (Bayliss 1902). Auch konnten die frühen Anatomen dem Pankreas keine Erkrankungen zuordnen. Als Erstbeschreiber einer Pankreatitis gilt der Holländer Nicholaes Tulp (1593-1674), der im Jahr 1652 das Pankreas eines autopsierten jungen Mannes als „geschwollen, eitrig und gefüllt mit viskosem Schleim“ beschrieb. Im Jahr 1761 berichtete Morgagni von einem Patienten, der über wiederholte Oberbauchschmerzen mit heftigem Erbrechen klagte und bei dessen Obduktion er ein geschwollenes und nekrotisches Pankreas vorfand. Diese frühen Beschreibungen unterschieden nicht zwischen akuter und chronischer Pankreatitis und die Ätiologie der Erkrankung war bis ins 19. Jahrhundert Gegenstand von Spekulationen (Pannala 2009). Erst der von Reginald Fitz im Jahr 1889 veröffentlichte Artikel mit dem Titel „Acute Pancreatitis: A Consideration of Hemorrhage, Hemorrhagic, Suppurative, and Gangrenous Pancreatitis, and of Disseminated Fat Necrosis“ gilt als erste systematische Analyse der Pankreatitis (Leach et al. 1990). Fitzgerald teilt in verschiedene ätiologische Ursachen ein, wie Gallensteine, Alkohol, nennt klinische Symptome und beschreibt pathologische Veränderungen des erkrankten Organs. Die Unterscheidung zwischen chronischer und akuter Pankreatitis etablierte sich erst im 20. Jahrhundert. Das von Comford 1946 vorgelegte Konzept zu den verschiedenen

Entitäten der chronischen Pankreatitis gilt als erstes schlüssiges Konzept zur Einteilung zwischen akuter und chronischer Pankreatitis (O'Reilly 2001).

3.2 DAS PANKREAS

Das Pankreas (dt. Bauchspeicheldrüse) ist beim Erwachsenen ein etwa 15-20cm langer, 3-4cm breiter und 1-2cm dicker Drüsenstrang mit einem Gewicht von 70-100g. Das Organ liegt sekundär retroperitoneal zwischen Magen, Milz, Leber und den großen Blutgefäßen des Bauchraums in der duodenalen C-Schlinge. Makroskopisch werden drei Abschnitte der Bauchspeicheldrüse unterschieden: Pankreaskopf (*Caput pancreatis*), Pankreaskörper (*Corpus pancreatis*) und Pankreasschwanz (*Cauda pancreatis*). Das Gewebe des Organs ist in Läppchen gegliedert, welche zur charakteristischen Struktur der Oberfläche führen. Das Pankreas besteht aus einem endokrinen und einem exokrinen Gewebeanteil. Der endokrine Anteil wird als Gesamtheit aller Langerhans-Inseln angesehen, welche sich in fünf peptid-hormonproduzierende Zellformen unterscheiden lassen: α -Zellen, β -Zellen, δ -Zellen, ϵ -Zellen und PP-Zellen. Sie sezernieren verschiedene Hormone, Insulin (β -Zelle) und Glukagon (α -Zelle), Somatostatin (δ -Zelle), Pankreaspolypeptid (PP-Zelle) und Grehlin (ϵ -Zellen). Der exokrine Anteil des Pankreas ist eine rein seröse Drüse, welche pro Tag etwa 1-2l dünnflüssigen, isotonen, bikarbonat- und enzymreichen Bauchspeichel produziert und über den *Ductus pancreaticus* in das Duodenum abgibt. Das Sekret hat einen pH-Wert von 8,0 bis 8,4 und enthält neben Wasser Elektrolyte, Anionen und Enzyme. Die morphologische und funktionelle Grundeinheit des exokrinen Pankreas stellen die Azinuszellen dar. Die pyramidenförmige Azinuszelle misst in der Höhe circa 12-15 μ m und begrenzt mit ihrer Membran das Azinulumen. Die mikroskopisch körnig erscheinende Struktur der Azinuszellen ist bedingt durch die azidophilen Zymogengranula. Jeder Azinus ist über das Schaltstück mit den intralobulären Ausführungsgängen verbunden, die dann in die interlobulären Ausführungsgänge münden, welche wiederum in den *Ductus pancreaticus* münden. Die Ausführungsgänge bestehen aus einem allmählich an Höhe zunehmenden prismatischen Epithel. Neben den interlobulären Ausführungsgängen finden sich im Interstitium des exokrinen Pankreas Fibrozyten,

Vitamin-A speichernde pankreatische Sternzellen, Blutgefäße und Nerven. Die wichtigsten von den Azinuszellen gebildeten Enzyme sind Peptidasen (Trypsin (Trypsinogen), Chymotrypsin (Chymotrypsinogen, Carboxypeptidase), Lipasen (Lipase, Phospholipasen, Cholinesterase), Ribonukleasen und α -Amylase. Sie sind essentieller Bestandteil der Verwertung von Eiweißen, Nukleinsäuren, Kohlehydraten und Fetten und werden im Pankreas als inaktive Vorstufen gespeichert, um eine Autodigestion des Pankreas zu vermeiden. Die Aktivierung erfolgt dann im Duodenum durch im Darmepithel gebildete Enteropeptidasen. Lediglich Amylasen, Lipasen und DNAsen werden in bereits aktiver Form gebildet. Die Regulation der Pankreassekretion wird durch eine enge Interaktion hormoneller und neuronaler Systeme beeinflusst. Sie unterliegt einem funktionellen gastro-entero-pankreatischen Kreislauf.

3.3 MIKROZIRKULATION DES PANKREAS

Die Kenntnisse zur mikroskopischen Anatomie des Pankreas *in situ* gehen wesentlich auf Studien von Robert McCuskey zurück. In seiner Arbeit „Microscopy of the living pancreas“ (McCuskey et al. 1969) beschrieb McCuskey detailliert die mikroskopische Anatomie des Pankreas anhand intravitaler Mikroskopie an Mäusen. Das Hauptaugenmerk seiner Untersuchungen galt der Zellmorphologie und Exozytose der Azinuszellen sowie der Mikrozirkulation des Pankreas. McCuskey zeigte, dass das endokrine und exokrine Pankreas jeweils eine separate Blutversorgung besitzen, die lediglich durch wenige Anastomosen miteinander verbunden ist (Abb. 1). Gespeist werden die Gefäßsysteme jeweils aus den Interlobulararterien. Weiterhin beschrieb er, dass sich die Vaskularisierungen im endokrinen und exokrinen Pankreas morphologisch grundlegend unterscheiden: Im endokrinen Pankreas befindet sich ein wesentlich dichteres Netz an Kapillaren als im exokrinen Pankreas. Auch konnte er zeigen, dass der Blutfluss sowohl im exokrinen als auch im endokrinen Pankreas intermittierend ist.

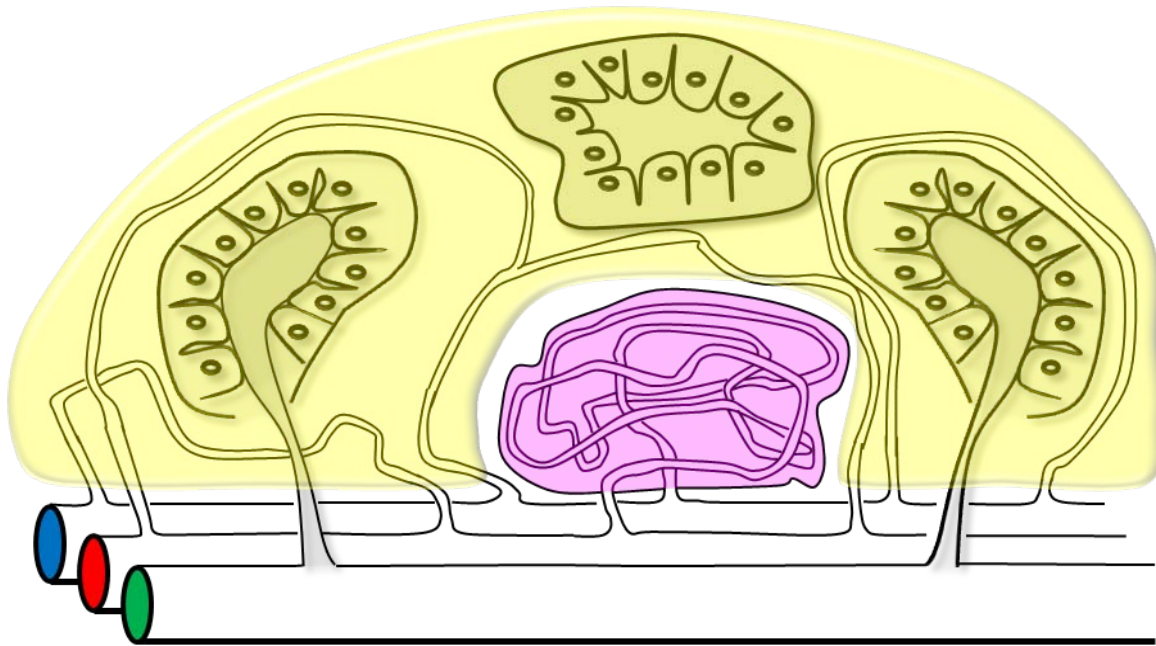


Abbildung 1: Schematische Darstellung der mikroskopischen Anatomie des Pankreas modifiziert nach McCuskey 1969: Das exokrine Pankreas (gelb) und das endokrine Pankreas (rosa) besitzen jeweils eine eigenständige Gefäßversorgung. Gespeist und drainiert werden die Kapillaren beider Gefäßsysteme aus den Interlobulararterien (rot) und den Interlobularvenen (blau). Das aus den Azinuszellen sezernierte pankreatische Sekret wird über interlobulare Ausführungsgänge (grün) in den Ductus pancreaticus abtransportiert.

3.4 PANKREATITIS

3.4.1 ALLGEMEINES

Der Begriff Pankreatitis beschreibt eine Vielzahl unterschiedlicher Entzündungsformen des exokrinen Pankreas, die sich hinsichtlich Ätiologie, Morphologie und Klinik grundlegend unterscheiden. Zunächst wird die akute von der chronischen Pankreatitis unterschieden, wobei jede Form der akuten Pankreatitis (AP) in eine chronische Pankreatitis (CP) übergehen kann (Matos et. al. 2006). Die AP ist definiert als autodigestiv induzierte Entzündung des exokrinen Pankreas verbunden mit akuten Oberbauchschmerzen. Dabei wird zwischen einer milden ödematösen Form und einer schweren nekrotisierenden Form unterschieden. Die CP ist definiert als schubweise verlaufende, chronische Entzündung der Bauchspeicheldrüse, die sich morphologisch durch entzündliche Infiltration und Fibrosierung des Pankreasparenchyms, Gangunregelmäßigkeiten, Konkreme im Pankreasgangsystem,

Gangobstruktionen sowie fokale Nekrosen und Pseudozysten auszeichnet. Infolge der chronischen Entzündung kommt es zu einer irreversiblen Zerstörung des Drüsengewebes mit sukzessiven Funktionseinschränkungen bis hin zur exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz (König et al. 2008). Die Inzidenz der AP liegt in westlichen Industrieländern zwischen 10-80/100.000 Einwohnern. Die Inzidenz bei Männern liegt um 10–30% über der von Frauen. Zudem nimmt im Vergleich zu Zahlen aus den 70er- und 80er-Jahren die Zahl der Neuerkrankungen beständig zu. Die Mortalitätsrate wird mit etwa 1/100.000 Einwohner angegeben (Toouli et al. 2002). Die CP ist mit einer Inzidenz von ca. 8 Fällen pro 100.000 Einwohnern und einer Prävalenz von ca. 40-70 Erkrankten pro 100.000 Einwohner selten, in den letzten Jahren jedoch von steigender Tendenz (König et al. 2008). Die Pankreatitis gehört zu den häufigeren Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und ist, nicht zuletzt aufgrund der beträchtlichen Behandlungskosten, von hoher sozioökonomischer Relevanz (Ahmed et al. 2006). Ätiologisch stehen in den industrialisierten Ländern als Ursache der AP obstruierende Gallensteine an erster Stelle. Der Alkoholabusus ist die häufigste Ursache der CP und ist hier für etwa 80% der Fälle verantwortlich, wobei nur etwa 10% der Alkoholiker eine CP entwickeln (Klöppel et al. 2005a). Weitere Ursachen sind obstruktiver oder toxischer Natur. Als idiopathische Pankreatitiden werden chronische Pankreatitiden bezeichnet, deren Ätiologie unbekannt ist. Durch genetische und immunologische Untersuchungen konnten in den letzten Jahren weitere für die CP verantwortliche pathogenetische Faktoren entdeckt werden und so der Anteil idiopathischer Pankreatitiden im Patientengut reduziert werden (Tab. 1).

chronische Pankreatitis	Pathogenetische Faktoren
toxisch-metabolisch	<ul style="list-style-type: none"> - Alkohol - Tabak - Hyperkalzämie - Hypertriglyzeridämie - Medikamente - Toxine
idiopathisch	<ul style="list-style-type: none"> - Early onset, late onset - Tropisch-kalzifizierend
genetisch	Autosomal-dominant: <ul style="list-style-type: none"> - Mutation (R122H) im Kationischen Trypsinsogen I (PRSS 1) Autosomal-rezessiv (geringe Penetranz): <ul style="list-style-type: none"> - CFTR - SPINK und weitere
autoimmun	<ul style="list-style-type: none"> - Isolierte autoimmune Pankreatitis - Autoimmunes Syndrom bei IgG4 assoziierter sklerosierender Erkrankung
rezidivierende akut	<ul style="list-style-type: none"> - Postnekrotische chronische Pankreatitis - Rezidivierende schwere akute Pankreatitis - Vaskulär/ischiämisch bedingte Pankreatitis
obstruktiv	<ul style="list-style-type: none"> - Gangobstruktion - Dysfunktion des Sphinkter Oddi - Posttraumatische Vernarbungen

Tabelle 1: Die TIGAR-O-Klassifikation gibt einen Überblick über die mannigfaltige Ätiologie chronischer Pankreatitiden (modifiziert nach Etemad und Whitcomb 2001).

Kardinalsymptom der AP ist der abdominelle Dauerschmerz, der in der Regel akut im Epigastrium einsetzt. Die Schmerzintensität variiert dabei stark und korreliert zumeist nicht mit dem eher harmlosen abdominalen Palpationsbefund. Aufgrund der retroperitonealen Organlage zielt die typische Ausstrahlung Richtung Rücken, Schulter und Flanke. Ein wichtiges Zeichen der Erkrankung ist Fieber. Die meisten Patienten entwickeln initial als Ausdruck der Hyperinflammation Temperaturen um 39°C. Neben Übelkeit, Erbrechen und reflektorischer Darmparalyse betreffen weitere Symptome vor allen Dingen die systemische Entzündungsantwort. Dazu gehören neben der pulmonalen Dysfunktion, Tachykardie, Hypotension, Oligurie und Elektrolytentgleisungen. Das klinische Erscheinungsbild der AP reicht dabei von geringer Beeinträchtigung bis zum Schock (Krones et al. 2006).

Die CP zeigt einen individuell sehr variablen Verlauf und reicht von hochakuten Zuständen mit heftigen abdominellen Schmerzen bis hin zu einer sich langsam

entwickelnden Kachexie. Zu den Leitsymptomen der Erkrankung gehören rezidivierende, gürtelförmig ausstrahlende Oberbauchschmerzen, Symptome der Maldigestion, wie chronische Diarrhö und Gewichtsverlust. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zum Verlust der exokrinen und endokrinen Funktion des Pankreas, wobei der Verlust der endokrinen Funktion häufig erst nach dem Verlust der exokrinen Funktion erfolgt (Finkelberg et al. 2006).

3.4.2 PATHOPHYSIOLOGIE DER AKUTEN PANKREATITIS

Die Pathogenese der AP ist bis heute Gegenstand kontroverser Diskussion und noch immer nicht vollständig verstanden. Als entscheidender Faktor in der Entstehung einer AP gilt heute die unkontrollierte Aktivierung von Trypsin in den Azinuszellen des Pankreas und die dadurch in Gang kommende Autodigestion und Inflammation der Drüse (Frossard et al. 2008). Unter physiologischen Bedingungen verhindern verschiedene Mechanismen, dass es zur intrazellulären Aktivierung kommt: So wird Trypsin als inaktive Vorstufe gebildet und in membranumhüllten Zymogengranula gespeichert. Die Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin wird außerdem durch spezifische Inhibitoren wie der „serin-protease-inhibitor Kazal 1“ (SPINK 1) verhindert und aktiviertes Trypsin wird autolysiert. Kommt es zu Störungen der Organintegrität, wie zum Beispiel durch Druckerhöhung im Ductus pancreaticus bei Steinleiden, pankreatischer Hyperstimulation oder direkter Schädigung der Azinuszellen durch Alkohol, kann es zum Versagen dieser Schutzmechanismen kommen. Es folgt eine intrazelluläre Enzymaktivierung und die damit verbundene Autodigestion und lokale Inflammation in der Drüse. Trypsinogen kommt hierbei eine Schlüsselfunktion zu. Einmal zu Trypsin aktiviert, kommt es zur Aktivierung zahlreicher weiterer Enzyme in den Azinuszellen. Neben der Phospholipase A2 und der Elastase werden das Komplementsystem sowie Kinine aktiviert. Des Weiteren kommt es zur lokalen Bildung von Entzündungsmediatoren, wie Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α durch neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten (Brivet et al. 1999). Dies führt zur Aktivierung von Endothelzellen und ermöglicht so die transendotheliale Migration von Leukozyten, die dann weitere Entzündungsmediatoren freisetzen und zur Störungen der

pankreatischen Mikrozirkulation führen (Frossard et al. 1999). Auch die Bildung freier Sauerstoffradikale führt durch oxidativen Stress zur Organschädigung (Poch et al. 1999).

3.4.3 PATHOPHYSIOLOGIE DER CHRONISCHEN PANKREATITIS

Unter dem Begriff der CP wird ein heterogenes Krankheitsbild zusammengefasst, dessen zentrales Merkmal die chronische Entzündung des Pankreasparenchyms mit folgender Fibrose und Atrophie des Drüsengewebes bis hin zur exokrinen und endokrinen Insuffizienz ist. Die Entstehung der Fibrose wird heute mit der Nekrose-Fibrose-Hypothese erklärt, die anhand des Krankheitsgeschehens der alkoholtoxischen Pankreatitis entwickelt wurde. Diese geht davon aus, dass sich die CP über Schübe schwerer akuter alkoholbedingter Pankreatitiden entwickelt (Abb. 2). Eine Nekrose-Fibrose-Sequenz wird jedoch auch für andere Formen der CP angenommen (Witt et al. 2007).

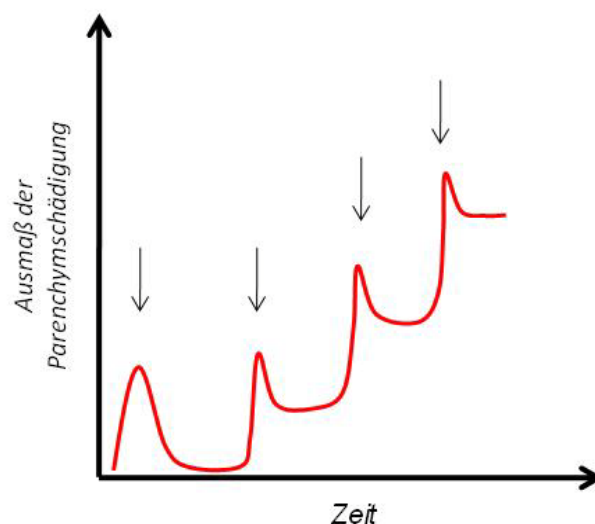


Abbildung 2: Die Entstehung der für die chronische Pankreatitis typischen Fibrose wird mit der Nekrose-Fibrose-Hypothese erklärt, welche anhand des Krankheitsablaufes der alkoholtoxischen Pankreatitis entwickelt wurde. Diese geht davon aus, dass sich die Fibrose der chronischen Pankreatitis über Schübe schwerer akuter alkoholbedingter Pankreatitiden (→) entwickelt (nach Witt et al. 2007).

Ausgelöst durch die rezidivierend auftretenden autodigestiven Nekrosen und deren Resorption durch Makrophagen kommt es zur Entwicklung einer zunehmenden Fibrose, die zuerst inter/perilobulär auftritt und dann später auch die Lobuli erfasst. Als gesichert gilt, dass die 1998 von Bachem und Mitarbeitern erstmals isolierten pankreatischen Sternzellen der Auslöser einer pankreatischen Fibrose sind (Bachem et al. 1998). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sowohl Entzündungsmediatoren wie *platelet derived growth factor* (PDGF), TNF- α , *tissue growth factor* (TGF)- β , IL-1 und IL-6 als auch Ethanol und Acetaldehyd in der Lage sind, pankreatische Sternzellen zu aktivieren (Apte et al. 2004). Die aktivierten Sternzellen wandeln sich in Myofibroblasten um. Die Myofibroblasten produzieren dann extrazelluläre Matrix, bestehend aus Proteinen wie Kollagen 1, Kollagen 3 und Fibronektin, welche den Hauptbestandteil des fibrotischen Gewebes bilden (Omary et al. 2007). Da die Fibrose jedoch nur die gemeinsame Endstrecke der Erkrankung darstellt, liegen den einzelnen Formen der CP verschiedene pathophysiologische Ursachen zugrunde (Tab. 1).

Die chronische alkoholtoxische Pankreatitis ist die häufigste Form der CP. Allen Untersuchungen zur Pathogenese der alkoholtoxischen Pankreatitis liegen zwei wesentliche Beobachtungen zugrunde: Erstens zeigt sich, dass es eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Alkohol und der Entwicklung von Pankreatitiden gibt (Bourliere et al. 1991) und zweitens entwickelt nur ein Bruchteil der schweren Alkoholiker eine Pankreatitis, was zeigt, dass es zusätzliche Cofaktoren geben muss, die die Entwicklung einer alkoholtoxischen Pankreatitis triggern (Steinberg & Tenner 1994). Auch wenn der genaue Mechanismus der Toxizität von Alkohol weiterhin umstritten ist, so gilt es heute doch als gesichert, dass Alkohol in verschiedener Weise toxisch auf Azinuszellen wirkt. So konnte gezeigt werden, dass die Azinuszellen des Pankreas analog zur Leber sowohl oxidativ (Haber et al. 1998) als auch nicht oxidativ (Laposata et al. 1986) Alkohol metabolisieren und so toxische Metabolite, wie Acetaldehyd und oxidativen Stress, produzieren. Weiterhin konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass mit Ethanol gefütterte Ratten erhöhte mRNA-Level der digestiven Enzyme Trysinogen, Chymotrypsinogen, Lipase und Cathepsin B aufweisen (Apte et al. 1995). Gleichzeitig kommt es zu einer Störung der Sekretion von Zymogengranula und zu einer Instabilisierung der die digestiven Enzyme speichernden Zymogengranula in den Azinuszellen. Dies könnte bewirken, dass der intrazelluläre Enzymgehalt ansteigt und es zur intrazellulären Enzymaktivierung

kommt, was zur Entzündung des Organs führen würde (Haber et al. 1994; Deng et al. 2004).

Eine weitere Form der CP stellt die chronische hereditäre Pankreatitis (CHP) dar. Durch Entschlüsselung der für die CHP verantwortlichen Gene konnte ein wichtiger Teil zum Verständnis der CP beigetragen werden. Bei der CHP kommt es durch verschiedene Mutationen zum Ungleichgewicht zwischen den vor intrazellulärer Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin schützenden Faktoren und der Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin (Abb. 3).

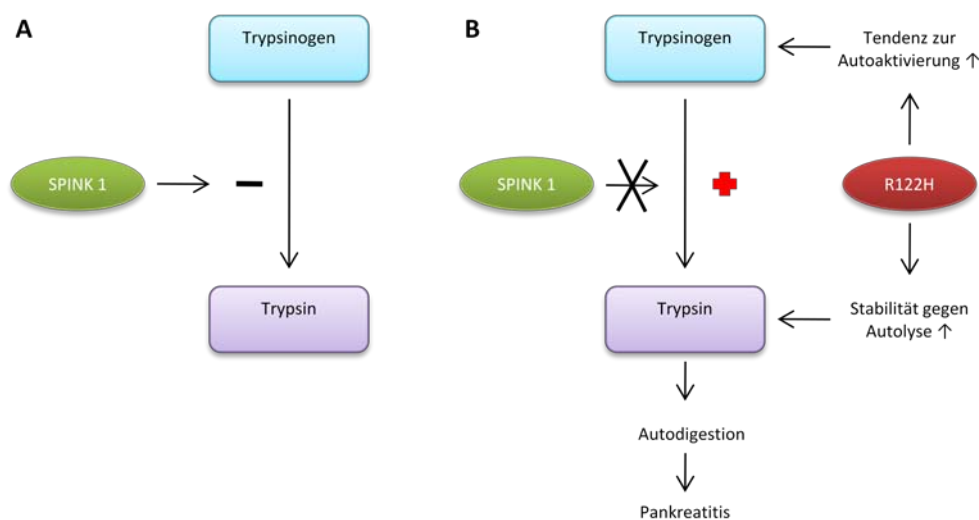


Abbildung 3: Zur hereditären Pankreatitis kommt es, wenn die Funktion von Schutzmechanismen gegen die intrazelluläre Trypsinaktivierung genetisch bedingt gestört ist. SPINK 1 ist ein kompetenter Inhibitor der intrazellulären Trypsinaktivität (A.) Durch Mutation von SPINK 1 oder durch die R122H Mutation im PRSS 1 Trypsin-Isoenzym kann die intrazelluläre Trypsinaktivität erhöht sein und so eine chronische Pankreatitis entstehen (B). Zeichnung modifiziert nach Witt et al. 2007.

Von den drei Trypsin Isoenzymen (Kationisches Trypsinogen (PRSS 1), anionisches Trypsinogen (PRSS 2) und Mesotrypsinogen (PRSS 3)) führen insbesondere Mutationen des PRSS 1 Isoenzym zu erhöhter intrapankreatischer Trypsinogenaktivität. Die 1996 von Whitcomb identifizierte R122H Mutation im PRSS 1 Gen ist die am häufigsten für die CHP verantwortliche Mutation und folgt einem dominanten Erbgang mit unvollständiger Penetranz (Whitcomb et al. 1996). Als „Gain of Function“ Mutation bewirkt R122H eine verstärkte Autoaktivierung von Trypsinogen

zu Trypsin und macht aktiviertes Trypsin resistenter gegen Inaktivierung (Sahin-Toth et al. 2000). Witt und Mitarbeiter konnten ebenfalls zeigen, dass bestimmte Mutationen zur Entstehung einer CP prädisponieren. Bei Patienten, die an einer alkoholtoxischen Pankreatitis leiden, tritt gehäuft eine Mutation im SPINK 1-Gen auf, einem kompetenten Trypsin Inhibitor (Witt et al. 2001).

3.5 AUTOIMMUNPANKREATITIS

3.5.1 DEFINITION

In Analogie zu anderen Organen wird auch für das Pankreas seit einigen Jahren eine autoimmune Erkrankung postuliert. Sarles et al. berichteten schon 1961 von einer nicht alkoholischen Pankreatitis, die in Zusammenhang mit einer Hypergammaimmunglobulie steht (Sarles 1961). Bis Yashia et al. 1995 den Term der Autoimmunpankreatitis (AIP) vorschlugen, existierten verschiedene Begriffe wie „sklerosierende Pankreatitis“ (Hamano et al. 2001), „lymphoplasmozytisch sklerosierende Pankreatitis“ (Kawaguchi et al. 1991), „pseudotumoröse Pankreatitis“ (Lammer et al. 1985), „sklerosierende Pankreatocholangitis“ (Horiuchi et al. 2001) und „chronische Pankreatitis mit diffuser Lumeneinengung des Pankreashauptgangs“ (Oi 1998). Diese Begriffe spiegeln histopathomorphologische oder radiologische Korrelate der AIP wider. Der Begriff AIP gilt heute allgemein als akzeptiert und wird weltweit als eigenständige Entität der CP wahrgenommen (Toomey et al. 2007; Klöppel et al. 2005b; Kamisawa et al. 2008).

3.5.2 EPIDEMIOLOGIE

Obwohl in zunehmenden Maße über AIP-Fälle berichtet wird, ist die genaue Prävalenz und Inzidenz nicht bekannt (Zandieh et al. 2007). Verschiedene Fallserien berichten, dass ca. 4-6% der an einer CP erkrankten Patienten an einer AIP leiden (Kim 2004; Pearson 2003). Etwa 2% der unter dem Verdacht eines Pankreaskarzinoms operierten Patienten zeigen bei der Untersuchung des bei der Operation resezierten Pankreasgewebes keine malignen Veränderungen, sondern vielmehr lymphoplasmazelluläre Infiltrate, welche das histologische Korrelat einer autoimmunen Erkrankung darstellen (Toomey et al. 2007). Bei Patienten, bei denen eine Pankreatoduodenektomie unter dem Verdacht einer benignen Neubildung vorgenommen wird, findet sich sogar in ca. 22% der Fälle eine AIP (Hardacre et al. 2003; Abraham et al. 2003b). Sowohl Männer als auch Frauen können an einer AIP erkranken, Männer sind jedoch häufiger betroffen als Frauen. Die Erkrankten haben eine weite Altersspanne, wobei die meisten Patienten über 50 Lebensjahre aufzeigen

(Finkelberg et al. 2006). Auch wenn die AIP in asiatischen Ländern wesentlich häufiger beobachtet wird als in westlichen Ländern, so nimmt die Aufmerksamkeit, die der AIP gewidmet wird, durch eine zunehmende Zahl an Fallberichten in den letzten Jahren auch in Europa und den USA zu (Kamisawa et al. 2008; Sutton et al. 2005).

3.5.3 PATHOGENESE UND DIAGNOSTIK DER AIP

Die Pathogenese der AIP konnte bisher trotz intensiver Bemühungen nicht geklärt werden. Insbesondere konnten weder ein spezifisches Antigen noch ein spezieller Trigger, der die Entstehung und das Voranschreiten der Krankheit bedingt, identifiziert werden (Fitzner et al. 2009). Die allgemein akzeptierte Hypothese, dass es sich bei der AIP um eine Erkrankung autoimmuner Genese handelt, stützt sich auf verschiedene labordiagnostische, histopathologische und genetische Beobachtungen der AIP, die im weiteren Text aufgeführt sind. Auch der dramatische Therapieerfolg durch Steroide gilt als wichtiger Hinweis, dass die AIP eine Erkrankung autoimmuner Genese ist (Klöppel et al. 2005b). Da eindeutige Parameter zur Feststellung einer AIP fehlen, kann die Diagnose nur anhand verschiedener Kombinationen radiologischer, serologischer und histologischer Befunde gestellt werden (Kamisawa 2008).

3.5.3.1 Histopathologie der AIP

Makroskopisch kann die AIP das duktales Pankreaskarzinom nachahmen. In bis zu 80% der Fälle wird eine tumorartige Masse im Pankreaskopf beschrieben (Klöppel et al. 2007). Das Organ kann im Bereich der Entzündung vergrößert und die lobuläre Struktur aufgehoben sein. Diese Veränderungen führen im Verlauf der Erkrankung zum Verschluss des Pankreashauptganges und häufig auch zum Verschluss des *Ductus choledochus* (Klöppel et al. 2005b). Die AIP differenziert sich von anderen Formen chronischer Pankreatitiden auch durch ihr mikroskopisches Bild. Hier zeigt sich als typisches Kennzeichen der AIP eine ausgeprägte peridukta-

Zellinfiltration um die mittel bis großen interlobulären Ausführungsgänge (Kawaguchi et al. 1991; Ectors et al. 1997).

Das inflammatorische Zellinfiltrat besteht überwiegend aus Lymphozyten und Plasmazellen. Makrophagen und Granulozyten sind eher selten anzutreffen (Klöppel et al. 2005b). In der akuten Entzündung kommt es zur zunehmenden Infiltration der Gangepithelien durch Entzündungszellen. Dies führt zu Verengung der Ausführungsgänge und kann den Gängen ein sternförmiges Lumen verleihen. Eine der Entzündung folgende periduktale Fibrose kann in einem späteren Stadium ebenfalls zur Einengung des Gangepithels führen. Ein weiteres wichtiges Kennzeichen der AIP ist die obliterative Phlebitis (Zhang et al. 2007; Abraham et al. 2003a). Immunhistochemisch zeigt sich, dass es sich bei den Lymphozyten überwiegend um $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen handelt, während B-Lymphozyten seltener anzutreffen sind (Uchida et al. 2000). Ein wichtiges Merkmal der Erkrankung ist jedoch die Infiltration $IgG4^+$ -Plasmazellen ins Pankreasparenchym, die sich bei 50-70% der Patienten mit AIP findet. Da sich diese jedoch auch bei der alkoholtoxischen Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom finden kann, ist insbesondere die Quantifizierung dieser Zellen von Bedeutung (Schneider & Löhr 2009). Die Fibrose als hervorstechendes Merkmal aller chronischen Pankreatitiden findet sich auch bei der AIP und folgt dem lymphoplasmazellulären Infiltrat (Klöppel et al. 2005b). Zunächst kommt es zur periduktalen Fibrose in schweren Fällen auch zur Fibrose des Azinusgewebes. Als Verursacher der Fibrose gelten analog zur alkoholtoxischen Pankreatitis die pankreatischen Sternzellen, welche zu Myofibroblasten aktiviert werden können. Detlefsen und Mitarbeiter konnten zeigen, dass es bei Patienten, die an AIP leiden, abhängig der Schwere der Erkrankung im entzündeten Pankreasgewebe zur vermehrten Expression profibrotischer Zytokine, wie von PDGF, TGF- β und deren Rezeptoren, kommt (Detlefsen et al. 2008). Diese chronischen Veränderungen sind in etwa 45% der Fälle durch akute, sogenannte granulozytäre epitheliale Läsionen begleitet. Diese Läsionen sind charakterisiert durch fokale Unterbrechungen und Zerstörungen des duktales Epithels, die durch einwandernde neutrophile, selten auch eosinophile Granulozyten entstehen (Ectors et al. 1997). Gelegentlich clustern sich die Granulozyten auch direkt unter dem Gangepithel. Diese Veränderungen werden hauptsächlich bei jüngeren Patienten beobachtet und scheinen eine Assoziation zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen aufzuweisen (Zamboni et al. 2004).

3.5.3.2 Klinisches Erscheinungsbild und systemische Manifestation der AIP

Die an AIP erkrankten Patienten werden aufgrund ihrer Symptomatik häufig mit der Verdachtsdiagnose eines Pankreaskarzinoms hospitalisiert (Kamisawa et al. 2003). Klinisch imponiert die AIP meist durch milde Oberbauchschmerzen, Gewichtsverluste, ikterische Beschwerden, rezidivierende Episoden chronischer Pankreatitiden oder durch einen sich neu manifestierenden Diabetes mellitus (Tab. 2) (Hardacre et al. 2003; Weber et al. 2003). Ein weiterer charakteristischer Befund der AIP ist die Assoziation mit anderen autoimmunen Erkrankungen. Eine systematische Aufarbeitung der Literatur durch Ohara et al. erbrachte eine Häufigkeit autoimmuner Begleiterkrankungen von 37% bei Patienten aus Japan und westlichen Ländern (Ohara et al. 2005). In Studien aus Europa zeigt sich jedoch wesentlich häufiger eine systemische Beteiligung. So zeigte sich in einer Fallserie der Universität Mannheim eine begleitende autoimmune Erkrankung bei 26 von 35 Patienten (Schneider & Löhr 2009). Erkrankungen, die in Begleitung der AIP beobachtet werden, sind das Sjögren-Syndrom, die skelosierende gang-destruierende Cholangitis, die sklerosierende extra-hepatische Cholangitis, die retroperitoneale Fibrose, die Hashimoto-Thyreoiditis, die rheumatoide Arthritis, der systemische Lupus erythematoses und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Jaster & Emmrich 2006). Die Tatsache, dass sich bei einigen der Patienten mit systemischer Beteiligung auch in anderen Organen, wie der Niere IgG4⁺-Plasmazellen finden, hat zur Postulierung einer IgG4-assoziierten Immunkomplex-erkrankung geführt (Neild et al. 2006). Diese beinhaltet die AIP als eine der Hauptmanifestationen zusammen mit der retroperitonealen Fibrose, der sklerosierenden Sialadenitis und der sklerosierenden Cholangitis (Kamisawa et al. 2006) und unterscheidet sich von der isoliert auftretenden AIP, die einige Autoren als primäre AIP bezeichnen (Park et al. 2009).

3.5.3.3 Bildgebung

Die derzeitige Studienlage beschreibt, dass die AIP bei rund 80% der Patienten mit einer tumorartigen Raumforderung im Pankreaskopf einhergeht. In Anbetracht dieser Häufigkeit ist das duktale Adenokarzinom des Pankreas die wichtigste Differentialdiagnose (Zamboni et al. 2004). Die sonographische Untersuchung des an einer AIP erkrankten Patienten zeigt meist ein diffus vergrößertes, echoarmes Organ (Kamisawa 2006). Im CT stellt sich beim Vorliegen einer AIP typischerweise ein diffus vergrößertes Organ mit einer so genannten „wurstartigen“ Erscheinungsform dar. Durch die entzündungsbedingten Veränderungen im peripankreatischen Fettgewebe kommt es gelegentlich zur Bildung eines hypodensen, kapselähnlichen Rings, auch als „Halo“ bezeichnet, um das Pankreas (Finkelberg et al. 2006). Die peripankreatischen Lymphknoten können sich vergrößert darstellen. Kalzifikationen oder Pseudozysten werden bei der AIP so gut wie nie beobachtet (Sahani et al. 2004). Die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) zeigt im Bereich des Pankreaskopfes häufig eine Verengung des *Ductus choledochus*. Auch der pankreatische Hauptgang ist häufig diffus verengt (Horiuchi et al. 2002; Kamisawa 2008). Da die Abgrenzung zum Pankreaskarzinom in der Bildgebung schwierig ist, spielt die endosonographisch gesteuerte Punktion eine wichtige Rolle, da so die Möglichkeit besteht, Material für eine histologische Untersuchung zu gewinnen (Levy et al. 2005).

3.5.3.4 IgG4 und weitere serologische Befunde der AIP

Erhöhte Werte für Immunglobuline und IgG4 sind ein charakteristischer Befund einer AIP (Hamano et al. 2001). Als erhöht gelten Werte für IgG über 1800 mg/dl und für IgG4 Werte über 135 mg/dl, wobei erhöhte Werte für IgG4 spezifischer und sensitiver für die AIP sind als erhöhte IgG Titer (Choi et al. 2007). Insgesamt zeigen sich für IgG4-Erhöhungen eine Sensitivität von 75% und eine Spezifität von 93% (Ghazale et al. 2007). Aufgrund der niedrigen Inzidenz der AIP und aufgrund der Tatsache, dass sich erhöhte Werte für IgG4 auch bei Pankreaskarzinomen und Gallengangskarzinomen finden, ergibt sich jedoch ein nur niedriger positiv prädiktiver Wert, so dass erhöhte Werte von IgG4 nicht alleine zur

Diagnosestellung einer AIP geeignet sind (Park et al. 2009). Weitere serologische Beobachtungen von AIP Patienten sind Antikörper gegen Carboanhydrase 2, Laktoferrin, Antinukleäre Antikörper (ANA) sowie positive Rheumafaktoren. Weiterhin zeigen sich erhöhte Werte für CD4 und CD8 positive HLA-DR ausprägende T-Zellen, wobei unter den CD4 positiven Zellen Interferon gamma produzierende Th1 Zellen gegenüber IL-4 produzierenden Th2 Zellen überwiegen (Okazaki et al. 2000). Kawa et al. konnten eine Assoziation des HLA Haplotyps DRB10405-DBQ10401 mit der AIP in der japanischen Bevölkerung nachweisen (Kawa et al. 2002).

3.5.4 DIAGNOSEKRITERIEN UND DIFFERENTIALDIAGNOSEN

Obwohl es sich bei der AIP um eine Form der CP handelt, ist die wichtigste Differentialdiagnose nicht eine CP anderer Genese, sondern das Adenokarzinom des Pankreas (Klöppel et al. 1998). Wegen des ähnlichen klinischen Erscheinungsbildes, den großen Parallelen in der Symptomatik (Tab. 2) und den nahezu identischen Befunden in bildgebenden Verfahren ist die Gefahr besonders groß, dass ein Karzinom als AIP oder eine AIP als Karzinom diagnostiziert wird (Gardner et al. 2009).

Charakteristika und Symptome der erkrankten Patienten	AIP (n = 37)	Karzinom (n = 45)
Durchschnittsalter in Jahren	62	67
Frauenanteil (%)	24	64
Bauchschmerzen (%)	54	53
Gewichtsverlust (%)	76	56
Ikterus (%)	84	84
Diabetes (%)	19	13
Autoimmune Vorerkrankungen (%)	24	0

Tabelle 2: Aufgrund der ähnlichen Symptomatik ist das Adenokarzinom des Pankreas die wichtigste Differentialdiagnose der Autoimmunpankreatitis (AIP). Hardacre et al. verglichen die Symptome von Patienten, die an einer AIP litten, mit denen von Karzinompatienten (Hardacre et al. 2003).

Um mögliche Fehldiagnosen zu vermeiden, wurden verschiedene Diagnose-Schemata entwickelt, wobei als diagnostischer Goldstandard die histologische Sicherung einer AIP gilt (Kleef et al. 2006). Die AIP kann jedoch auch anhand der Kombination verschiedener, nicht histologischer Parameter gestellt werden. Die Diagnose-Schemata der Japan-Pancreas-Society (Okazaki et al. 2007), der Mayo-Klinik (Chari et al. 2006) und das Mannheimer Diagnose Schema (Schneider & Lühr 2009) ziehen zur Diagnose der AIP die Kombination aus radiologischen, serologischen und histologischen Befunden sowie dem Ansprechen auf eine Steroid-Therapie heran (Tab. 3).

Kriterium	Japan-Kriterien	Mayo HISORt USA	Mannheim-Kriterien
Kriterium (I) <i>Bildgebung</i>	Typische Befunde: (a) CT, MRT, Ultraschall: Diffuse oder lokalisierte Vergrößerung des Pankreas und ERCP: diffuse oder segmentale Verengung des Pankreashauptgangs mit unregelmäßiger Begrenzung	Typische Befunde: (a) CT, MRT: diffus vergrößertes Pankreas mit verzögertem, rinnenartigem Enhancement und ERCP: diffus irregulärer, betonter Pankreashauptgang Atypische Befunde: (b) fokale Raumforderung des Pankreas, fokale Pankreashauptgangstriktur, akute Pankreatitis, Pankreasatrophie, Verkalkung	Typische Befunde: (a) CT, MRT, Ultraschall: diffuse oder lokalisierte Schwellung des Organs und ERCP: diffuse oder fokale Gangverschmälerung und Unregelmäßigkeit des Pankreashauptgangs Atypische Befunde: (b) Pankreaserkrankung unklarer Ätiologie (z. B. akute Pankreatitis, Pankreasatrophie, Verkalkung)
Kriterium (II) <i>Laborwerte</i>	(a) Erhöhte Serumwerte für Gammaglobulin, IgG oder IgG4 oder (b) Nachweis von Autoantikörpern	(a) Erhöhte Serumwerte für IgG4	(a) Erhöhte Serumwerte für IgG4 oder (b) Nachweis von Autoantikörpern, Gammaglobulin oder IgG
Kriterium (III) <i>Histologie</i>	(a) Ausgeprägte interlobuläre Fibrose und lymphoplasmazelluläre Infiltration	(a) Peridukale lymphoplasmazelluläre Infiltrate, obliterative Phlebitis und Fibrose (b) Mindestens 10 IgG4-positive Zellen/High-Power-Field des lymphoplasmazellulären Infiltrats im Pankreas	(a) Dichte lymphoplasmazelluläre Infiltration und Zerstörung des Organs, „destruktive Pankreatitis“, Nachweis von granulozytären epithelialen Läsionen (b) mindestens 10 IgG4-positive Zellen/High-Power-Field in einem extrapancreatisch befallenen Organen
Kriterium (IV) <i>Ansprechen auf Steroide</i>	Nicht beinhaltet	Auflösen bzw. ausgeprägte Verbesserung der pankreatischen und/oder extrapancreatischen Befunde	(a) Abklingen/deutliche Verbesserung der Befunde des Pankreas oder (b) der beteiligten Organe
Kriterium (V) <i>Assoziation mit anderen Autoimmunen Erkrankungen</i>	Nicht beinhaltet	Hiläre/intrahepatische Strikturen, persistierende distale biliäre Strikturen, Befall der Speicheldrüsen, mediastinale Lymphadenopathie, retroperitoneale Fibrose, bestätigt durch den Nachweis IgG4-positiver Zellen	Nachweis einer anderen Autoimmunen Erkrankung
Etablierung der Diagnose anhand der vorliegenden Kriterien	Gesicherte AIP: I + II I + III	Gesicherte AIP: III (a oder b) alleine Ia + II Ib (Pankreaserkrankung unklarer Ätiologie) + IV + II und/oder V	Gesicherte AIP: IIIa alleine Ia + II Ib + IV + IIa and/or IIIb Ib + IV + IIb and/or V Wahrscheinliche AIP: Ib + II + V Mögliche AIP: Ib + II oder Ib + V

Tabelle 3: Verschiedene Diagnoseschemata wurden zur Diagnose der AIP publiziert. Hier exemplarisch die Diagnoseschemata der Japan Pancreas Society, das HISORt der Mayo Klinik, und das Mannheimer Diagnose Schema (modifiziert nach Schneider et al. 2009).

3.5.5 THERAPIE UND PROGNOSE DER AIP

Das dramatische Ansprechen der AIP auf die Therapie mit Steroiden ist ein wohl bekanntes Phänomen, (Kim et al. 2004). Kamisawa fordert, dass vor Beginn der Steroid-Therapie ein möglicherweise vorliegender Ikterus obstruktiver Genese entweder endoskopisch oder durch eine perkutane transhepatische Gallengangsdrainage beseitigt werden muss. Liegt ein Diabetes vor, so muss dieser vor Therapiebeginn eingestellt werden (Kamisawa et al. 2007). Die Behandlung mit Glucokortikoiden erfolgt durch die orale Gabe von Prednisolon in einer Dosierung von 40 mg/d für 1-2 Monate (Chari et al. 2007). Nach Beginn der Behandlung muss in regelmäßigen Abständen durch radiologische und serologische Untersuchungen der Krankheitsverlauf dokumentiert werden. Unter Therapie kommt es normalerweise innerhalb weniger Wochen zu einer Größenregression des Pankreastumors und zu einer Rückbildung der Gallengangsstenose, so dass die Gallengangsdrainage überflüssig wird. Zeigt sich das Pankreas radiologisch ohne Befund, kann die Therapie mit Glucokortikoiden beendet werden (Kamisawa et al. 2007). Um eine unnötige Verzögerung der Behandlung von Patienten, die an einem Karzinom erkrankt sind, zu verhindern, sollte sich 2-4 Wochen nach Beginn einer Steroid-Therapie alle radiologisch festgestellten tumorösen Vergrößerungen am Pankreas nahezu vollständig zurückgebildet haben. Verbleibende Tumoren müssen chirurgisch abgeklärt werden (Finkelberg et al. 2006). Die Langzeitprognose der AIP ist noch unklar. Die vorliegenden Untersuchungen nach Steroid-Therapie zeigten jedoch eine geringe Rezidivwahrscheinlichkeit der AIP von 1/23 Patienten (Horiuchi et al. 2002) und 1/17 Patienten (Kim et al. 2004). Der überwiegende Teil der Patienten wird jedoch operativ behandelt, entweder um eine mögliche Malignität auszuschließen oder da präoperativ fälschlicherweise die Verdachtsdiagnose eines Karzinoms gestellt wurde. Operationen an AIP Patienten zeigten jedoch eine Tendenz zu längeren Operationszeiten, größeren Blutverlusten und auch postoperativ erhöhten Komplikationsraten (Hardacre et al. 2003). Bei 9 der 17 AIP Patienten des Heidelberger Patientengutes kam es postoperativ zu einer klinischen Besserung mit allgemeinem Wohlbefinden (Kleef et al. 2006). Etwa 75% der von Weber chirurgisch behandelten Patienten waren zwei Jahre post OP beschwerdefrei (Weber et al. 2003). Toomey schlägt folgenden Behandlungsalgorithmus für Patienten die

aufgrund ihrer Symptomatik und eines bildgebenden Befundes potentiell an einer AIP erkrankt sein könnten vor (Abb. 4).

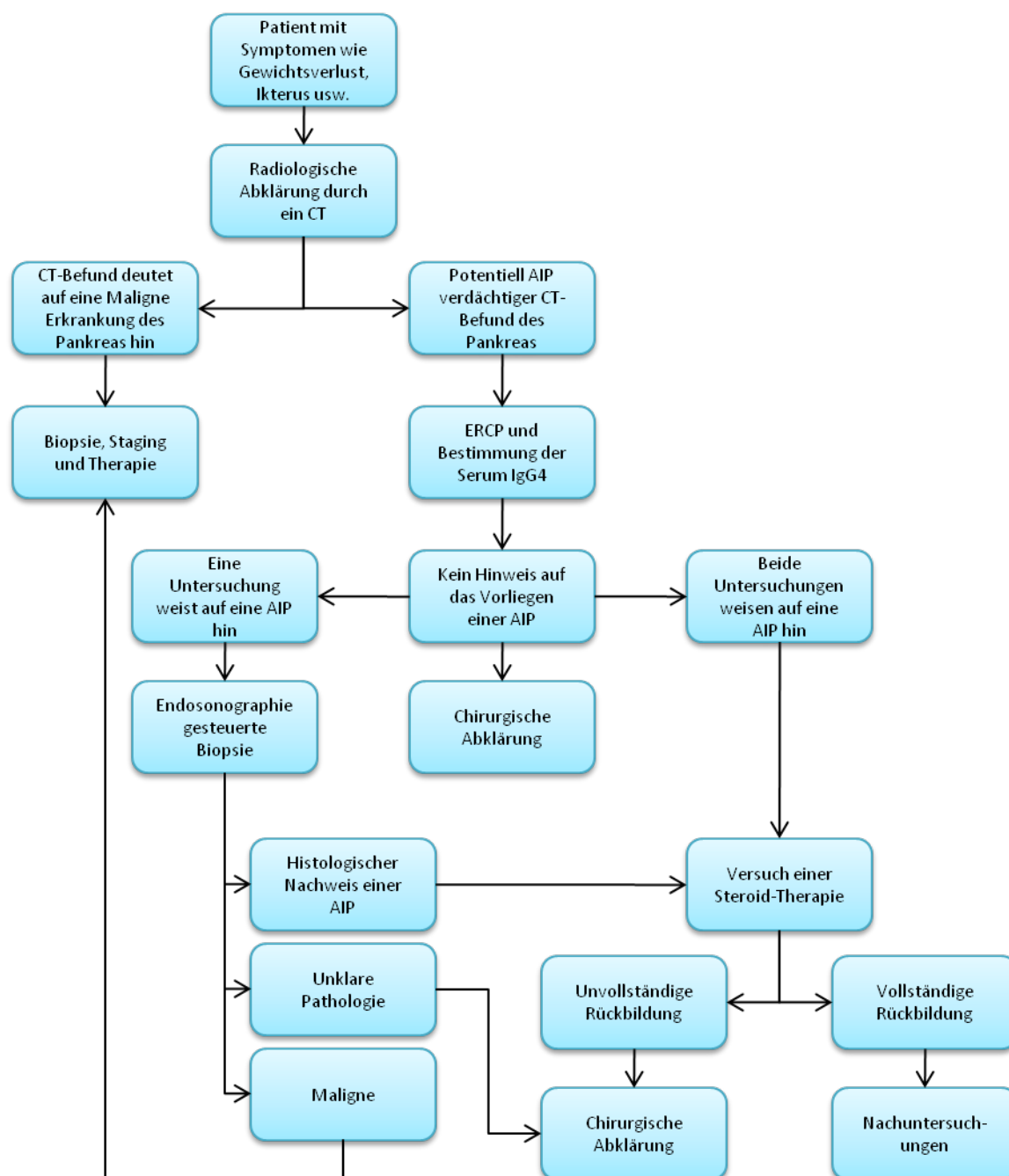


Abbildung 4: Behandlungsalgorithmus der AIP (modifiziert nach Toomey et. al 2007)

4 ZIEL DER STUDIE

Ziel der vorliegenden Studie war es, ein Tiermodell der AIP zu etablieren und zu charakterisieren. Mäuse des Stammes MRL/Mp können aufgrund ihres genetischen Hintergrundes neben zahlreichen anderen autoimmunen Erkrankungen auch eine Autoimmunpankreatitis entwickeln. Da die pathophysiologischen Mechanismen dieser Erkrankung bislang unbekannt sind, stellten wir uns für die vorliegende Arbeit folgende Fragen:

1. Mit welcher Inzidenz erkranken Mäuse des Stammes MRL/Mp an einer AIP?
2. Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Krankheitsinzidenz?
3. In welchem Alter manifestiert sich die Erkrankung?
4. Gehen der histopathologischen Manifestation der AIP mikrozirkulatorische oder serologische Veränderungen voraus?
5. Zu welchen mikrozirkulatorischen und serologischen Veränderungen kommt es im Krankheitsverlauf der AIP?
6. Aus welchen Zellen setzt sich das Entzündungsinfiltrat im erkrankten Pankreas zusammen?
7. Durch welche molekularbiologischen Charakteristika zeichnet sich das erkrankte Pankreasparenchym aus?

5 MATERIAL UND METHODIK

5.1 VERSUCHSTIERE

Die Untersuchungen wurden an männlichen und weiblichen Tieren des Inzuchtstammes Murphy Roth's Lange (MRL/MpJ) durchgeführt, welcher aus verschiedenen Inzuchtstämmen gekreuzt wurde: LG (75%), AKR/J (12,6%), C3H (12,1%) und C57BL/6 (0,3%) (<http://jaxmice.jax.org/strain/000485.html>). Die Tiere entstammten einer Zucht (Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) und wurden zu vier verschiedenen Alterszeitpunkten, d.h. 8-12, 16-20, 24-28 und 32-40 Wochen, untersucht. Die MRL/MpJ Mäuse wurden in einem klimatisierten Raum bei 12h Tag/Nachtrhythmus unter Bereitstellung von Standardfutter für Nager und Wasser *ad libitum* in Käfigen mit höchstens fünf Tieren gehalten. Die Tierversuche waren gemäß des Tierschutzgesetzes §8 (1) genehmigt. (Tierschutznummer: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-024/07).

5.2 EXPERIMENTELLES MODELL

5.2.1 MIKROZIRKULATIONSMODELL DES PANKREAS

Intravitalmikroskopische Modelle zur Untersuchung der Mikrozirkulation des zuvor chirurgisch präparierten Pankreas der Ratte wurden bereits für verschiedene Krankheitsbilder des Pankreas verwendet. So konnte Vollmar et al. unter Zuhilfenahme von intravitaler Fluoreszenzmikroskopie arterioläre Vasomotion in Pankreata von Ratten im hämorrhagischen Schock nachweisen (Vollmar et al. 1994). Auch der ischämische Reperfusionsschaden an Pankreata von Ratten war schon Gegenstand intravitalmikroskopischer Untersuchungen (Menger et al. 1996). Glawe et al. untersuchte intravitalmikroskopisch die Pankreasmikrozirkulation Dibutylzinn-dichlorid vorbehandelter Ratten anhand verschiedener Parameter, wie der kapillaren Fließgeschwindigkeit, der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, der nutritiven kapillaren Perfusionsdichte und der Fibrosierung als Folge entzündungsbedingter Kollagenablagerungen (Glawe et al. 2005).

Die Intravitalmikroskopie des Pankreas ist ein standardisiertes und reproduzierbares Verfahren zur Charakterisierung der Mikrozirkulation verschiedener Krankheitsbilder

des Pankreas. In der von uns durchgeführten Studie charakterisierten wir die Mikrozirkulation der AIP in der MRL/Mp-Maus.

5.2.2 ANÄSTHESIE

Vor Operationsbeginn wurden die Tiere mit Ketamin 90 mg/kg Körpergewicht (Ketamin[®], Betapharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland) und Xylazin 25 mg/kg Körpergewicht (Rompun[®], Bayer Vital GmbH, Bayer Health Care, Deutschland) i.p. narkotisiert. Anschließend wurden die Tiere bauchseitig und am Hals rasiert (Aesculap Favorita II, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und in Rückenlage positioniert. Um die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur der Tiere zu gewährleisten, wurden die Tiere durch eine elektronisch geregelte Heizplatte (Fa. Effenberger, Pfaffing, Deutschland) während der gesamten Untersuchung gewärmt.

5.2.3 MIKROCHIRURGISCHE PRÄPARATION

Zur Applikation der Farbstoffe erfolgte zunächst unter Zuhilfenahme eines Operationsstereomikroskops (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) die Präparation der rechten Vena jugularis zur Platzierung eines Gefäßkatheters (PE 10, innerer Durchmesser: 0,28mm). Zur Messung der mikrozirkulatorischen Parameter des Pankreas der Maus wurde das Abdomen über eine transverse Oberbauchlaparotomie eröffnet und der kraniale Wundrand mit zwei justierbaren Wundhaken offengehalten. Während der Dauer der Präparation wurden Leber, Magen und Intestinum mit feuchten Kompressen abgedeckt, um eine Austrocknung der abdominalen Organe zu verhindern. Zusätzlich wurde der Situs regelmäßig mit 37°C warmer physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet. Um eine Auslagerung des Pankreas mit der anhängenden Milz für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen, ohne die Integrität des Organs zu verletzen, wurden zunächst die *Aa. gastricae breves* ligiert und durchtrennt. Nachfolgend wurde das *Omentum majus* von der großen Kurvatur des Magens bis in Höhe des Pylorus abgesetzt. Anschließend wurden die zwischen dem kaudalen Pankreas und dem

Querkolon bestehenden Faszien gelöst und so Pankreasschwanz und Teile des Corpus vollständig mobilisiert. Dabei wurde darauf geachtet, das Pankreas selbst nicht zu berühren und die peritonealen Strukturen, in die das Pankreas eingebettet ist, nicht zu verletzen. So wurde sichergestellt, dass die Mikrozirkulation des Pankreas möglichst wenig beeinträchtigt wurde. Nun konnte das Pankreas unter Zuhilfenahme feuchter Wattestäbchen mitsamt der Milz auf ein anmodelliertes Plastelinbett, welches sich auf einem Beobachtungsständer befand, ausgelagert werden (Abb. 6). Um das Pankreas vor Austrocknung zu schützen und um eine möglichst plane Oberfläche für die mikroskopische Untersuchung zu schaffen wurde, es mit einer befeuchteten Folie abgedeckt und während der mikroskopischen Untersuchung wiederholt mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtet.

5.3 UNTERSUCHUNGSMETHODEN

5.3.1 INTRAVITALE FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Die Intravitalmikroskopie (IVM) ermöglicht die Lokalisierung bestimmter Bestandteile komplexer biomolekularer Strukturen, inklusive lebender Zellen. 1852 erkannte der Mathematiker George Gabriel Stokes, dass bestimmte Moleküle, sogenannte Fluorophore, Licht einer bestimmten Wellenlänge adsorbieren und dann Licht einer anderen, längerwelligen Wellenlänge emittieren. Die Differenz aus emittierter Wellenlänge (λ_{out}) und adsorbierter Wellenlänge (λ_{in}) ergibt entsprechend der Formel ($\lambda_s = \lambda_{\text{out}} - \lambda_{\text{in}}$) den sogenannten Stokes-Shift (λ_s). Jedes Fluorophor hat ein spezifisches Absorptionsspektrum, bei dem es angeregt wird (Exzitation) und ein Fluoreszenzspektrum (Emission), bei der die Detektion des Fluoreszenzlichts erfolgt. Die Intravitalmikroskopie erlaubt durch eine Auswahl bestimmter Filter, das helle Anregungslicht und das schwache Fluoreszenzlicht im Strahlengang des Mikroskops zu trennen und ermöglicht so die selektive Visualisierung spezifischer biologischer Strukturen (Abb. 5).

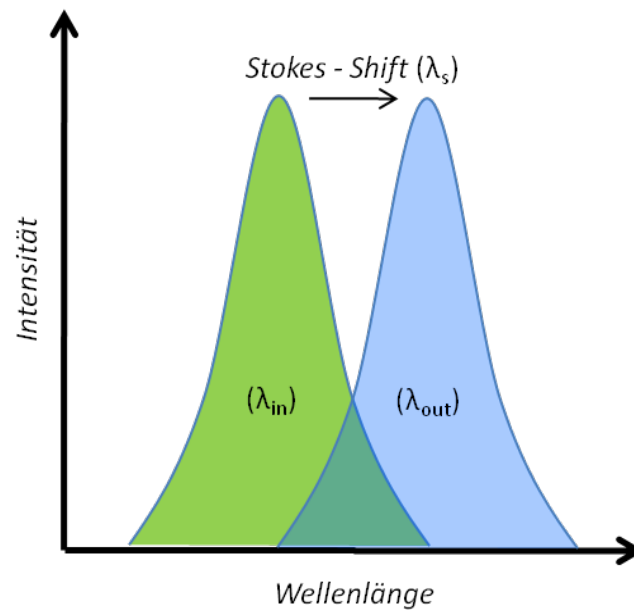


Abbildung 5: Wird ein Fluorophor mit Licht spezifischer Wellenlängen angeregt, λ_{in} (Exzitation), fluoresziert (Emission) es Licht einer spezifischen langwelligeren Wellenlänge. Die Differenz aus emittierter Wellenlänge (λ_{out}) und adsorbierter Wellenlänge (λ_{in}) ergibt entsprechend der Formel ($\lambda_s = \lambda_{out} - \lambda_{in}$) den Stokes-Shift (λ_s). Unter Zuhilfenahme spezieller Filter können Fluorophore durch ihr emittiertes Licht selektiv visualisiert und so zur Markierung biologischer Strukturen genutzt werden.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem modifizierten Epifluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss vorgenommen (Axiotech vario, Zeiss, Jena, Deutschland). Für die Analyse der Mikrozirkulation wurde die Maus mitsamt der Heizplatte unter ein Mikroskop gelagert, wobei die Heizplatte am Kopfende der Maus so angehoben wurde, dass eine Schräglage von ca. 30° entstand, um das ausgelagerte Pankreas in eine möglichst horizontale Ebene zu bringen. Die Epilluminations-Vorrichtung beinhaltete eine 100 W Quecksilberdampfampe mit einem Blaufilter (Exzitation: Wellenlänge=450-490 nm; Emission: Wellenlänge>515 nm) sowie einem Grünfilter (Exzitation: Wellenlänge = 510-560 nm; Emission: Wellenlänge > 580 nm) und einem UV-Filter (Exzitation: Wellenlänge = 330-380 nm; Emission: Wellenlänge > 415 nm).

Alle beobachteten Mikroskopbilder wurden durch ein Video-System (S-VHS Panasonic AG 7350-E, Matsushita, Tokio, Japan) für die offline Evaluierung durch eine CCD-Kamera (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) aufgenommen und auf einem Bildschirm mit Zwischenschaltung eines Zeitmarkengenerators (VTG-33, For-A, Tokio, Japan) dargestellt. Sämtliche Analysen mikrozirkulatorischer Parameter

wurden offline, d.h. nach Beendigung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie durch Wiedergabe des Videobandes mit dem softwareassistiertem Bildverarbeitungssystem (CapImage Version, 7.4, Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Hierdurch konnte der Untersuchungszeitraum und die Belastung für das Versuchstier auf ein Minimum reduziert werden.

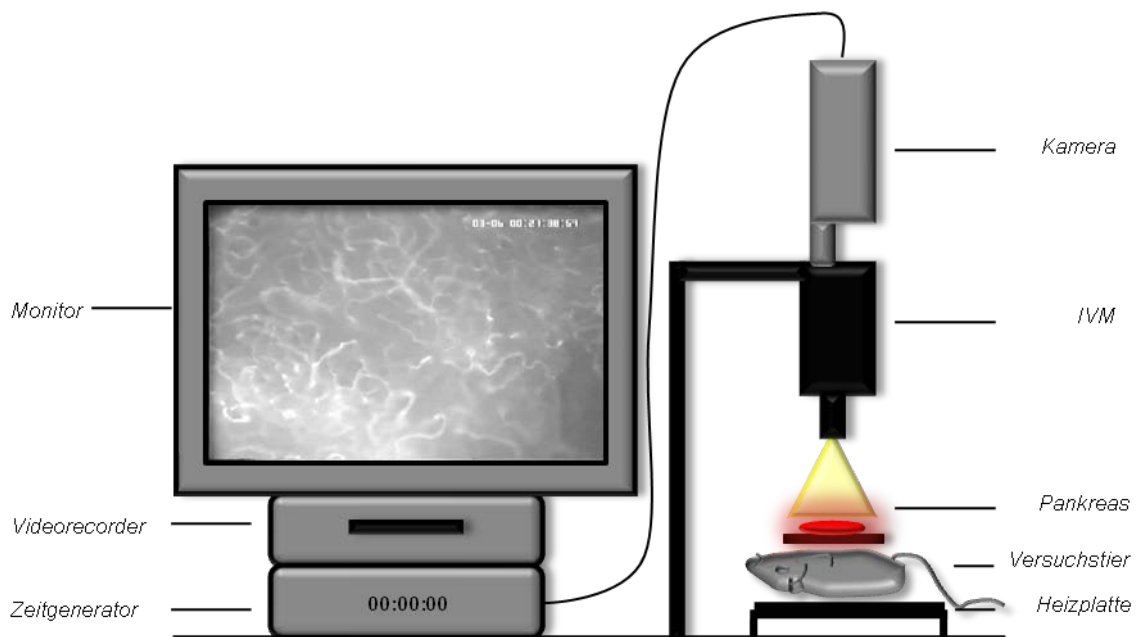


Abbildung 6: Versuchsanordnung der Intravitalmikroskopie. Die intravital-mikroskopischen Aufnahmen des auf ein Plastelinbett ausgelagerten Pankreas wurden von einer Kamera aufgezeichnet und nach Einspielung einer Zeitangabe auf einen Monitor übertragen. Nach Einstellung der gewünschten Aufnahme-position wurde das Bild durch einen Videorecorder aufgezeichnet.

5.3.2. MIKROHÄMODYNAMISCHES MONITORING

Zur Untersuchung der Mikrozirkulation des Pankreas wurde die Technik der intravitalen Multifluoreszenzmikroskopie angewendet. Diese Technik erlaubt die direkte Visualisierung von Kapillaren, Venolen, Pankreasinseln, Leukozyten, Fibrose sowie apoptotischen Zellkernen. Für die Übersichtsaufnahmen des Pankreasparenchyms und der Inseln wurde ein x20 Wasser-Immersionsobjektiv verwendet, für Aufnahmen von Venolen und Zellkernen ein x40 Wasser-Immersionsobjektiv (x20/0.50W und x40/0.80, Zeiss). Zur Kontrastverstärkung und Visualisierung des Gefäßnetzwerkes diente 0,1ml 2% Fluorescein-Isothiocyanat markiertes Dextran

(FITC), MG 150.000 D (Sigma-Chemical, Deisenhofen, Deutschland). Zur Darstellung von Leukozyten wurde 0,1ml 1% Rhodamine-6G (Sigma) und zur Anfärbung der Zellkerne 1% Bisbenzimid (Sigma) 0,1ml/100g KG i.v. injiziert. Die mikroskopierten Bilder wurden mit einer Videokamera aufgenommen und später mit Erfassung folgender mikrohämodynamischer Parameter quantitativ ausgewertet:

- *Kapillare und postkapillare Blutzellfließgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) (siehe 5.3.2.1)*
- *Funktionelle kapillare Dichte (cm/cm^2) (siehe 5.3.3.2)*
- *Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (siehe 5.3.2.3)*
- *Apoptotische Parenchymschäden ($n/\text{Fläche}$) (siehe 5.3.2.4)*

5.3.2.1 Kapillare und postkapillare Blutzellfließgeschwindigkeit

Die Messung der Blutzellfließgeschwindigkeit wurde in Kapillaren und Venolen sowohl in endokrinem als auch in exokrinem Gewebe durchgeführt. Zur Bestimmung der Blutzellfließgeschwindigkeit wurde die softwareassistierte Line-Shift-Diagramm-Methode angewendet (Klyscz et al. 1997). Entlang der Flussrichtung des zu messenden Gefäßes wird hierzu eine zentral im Lumen gelegene Messlinie definiert und anschließend das Videoband für circa 12s in Echtzeit abgespielt. Währenddessen wird fortlaufend für jedes Halbbild entlang der Messlinie das Grauwertprofil erstellt und in einem Bildspeicher aufgezeichnet. Aus den aneinander gereihten Grauwertprofilen erzeugt das Programm ein Line-Shift-Diagramm, in dem helle bzw. dunkle, schräge Linien zu erkennen sind, wenn sich während der Messung Plasmalücken bzw. Erythrozyten entlang der Messlinie bewegt haben (Abb. 7). Aus der Steigung dieser Linien kann anschließend die Blutzellfließgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ errechnet werden (Klyscz et al. 1997)

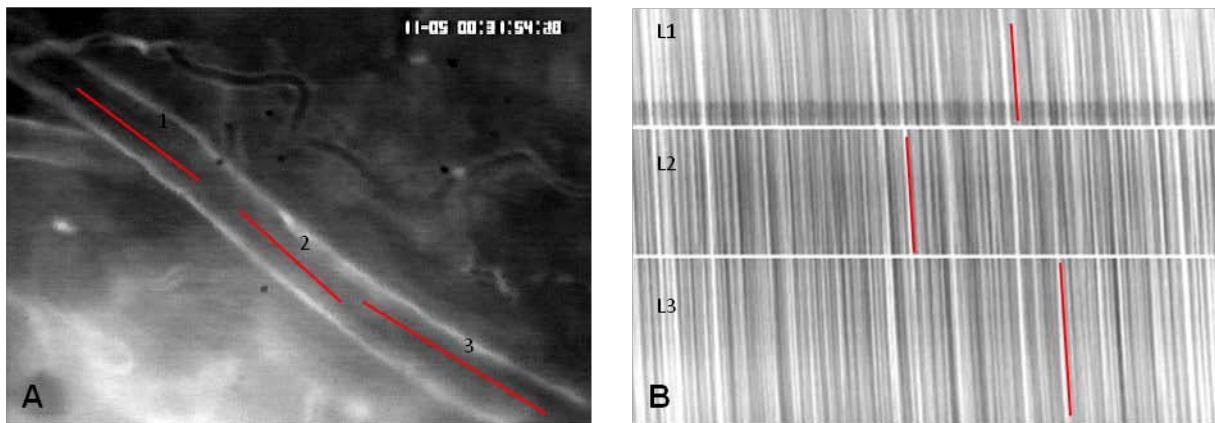


Abbildung 7: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahme einer Venole nach Kontrastierung des Plasmas mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran (A) mit 3 definierten Messlinien (1-3) zur softwaregestützten Erfassung der Blutzellgeschwindigkeit. Nach Abspielen des Videobandes für etwa 12s entsteht das Line-Shift-Diagramm (B) für jede der einzelnen Messlinien (L1-3), anhand derer die Geschwindigkeit des Blutflusses ($\mu\text{m/s}$) aus der Steigung (rote Linien 1-3) der aneinandergereihten Grauwertprofile errechnet werden kann.

5.3.2.2 Funktionelle kapillare Dichte

Die quantitative Analyse der mikrovaskulären Perfusion erfolgte anhand der Erfassung der funktionellen kapillaren Dichte (FKD), sowohl des exokrinen als auch des endokrinen Pankreasgewebes. Die Visualisierung der Kapillaren wurde durch Kontrastierung des Plasmas nach intravenöser Applikation von 0,1ml 2% FITC-Dextran ermöglicht. FITC-Dextran färbt nur das Blutplasma und bindet weder an Endothelzellen noch an individuelle Blutzellen. Pro Versuch wurden in randomisierter Abfolge acht Gesichtsfelder des exokrinen Pankreas bei 200facher Vergrößerung eingestellt. Jedes dieser Felder wurde über 30s beobachtet und auf Videoband aufgezeichnet, um die Perfusion darzustellen. Zur Darstellung der Perfusion des endokrinen Pankreasparenchyms wurden Inseln eingestellt und bei 400facher Vergrößerung für 30s aufgezeichnet. Die Bestimmung der FKD erfolgte dann softwaregestützt anhand der auf Videoband aufgezeichneten Bilder der Mikrozirkulation. Die FKD des exokrinen Pankreasparenchyms wurde bestimmt, indem die Gesamtlänge aller perfundierten Kapillaren (in cm) eines Gesichtsfeldes auf die Fläche des Feldes (in cm^2) bezogen wurde (Abb. 8A und B). Die FKD des endokrinen Pankreasparenchyms wurde bestimmt, indem die Gesamtlänge aller

perfundierten Kapillaren (in cm) der Insel auf die Fläche in cm^2 der Insel gemessen wurde (Abb. 8C und D). Die FCD wurde dann in cm/cm^2 angegeben.

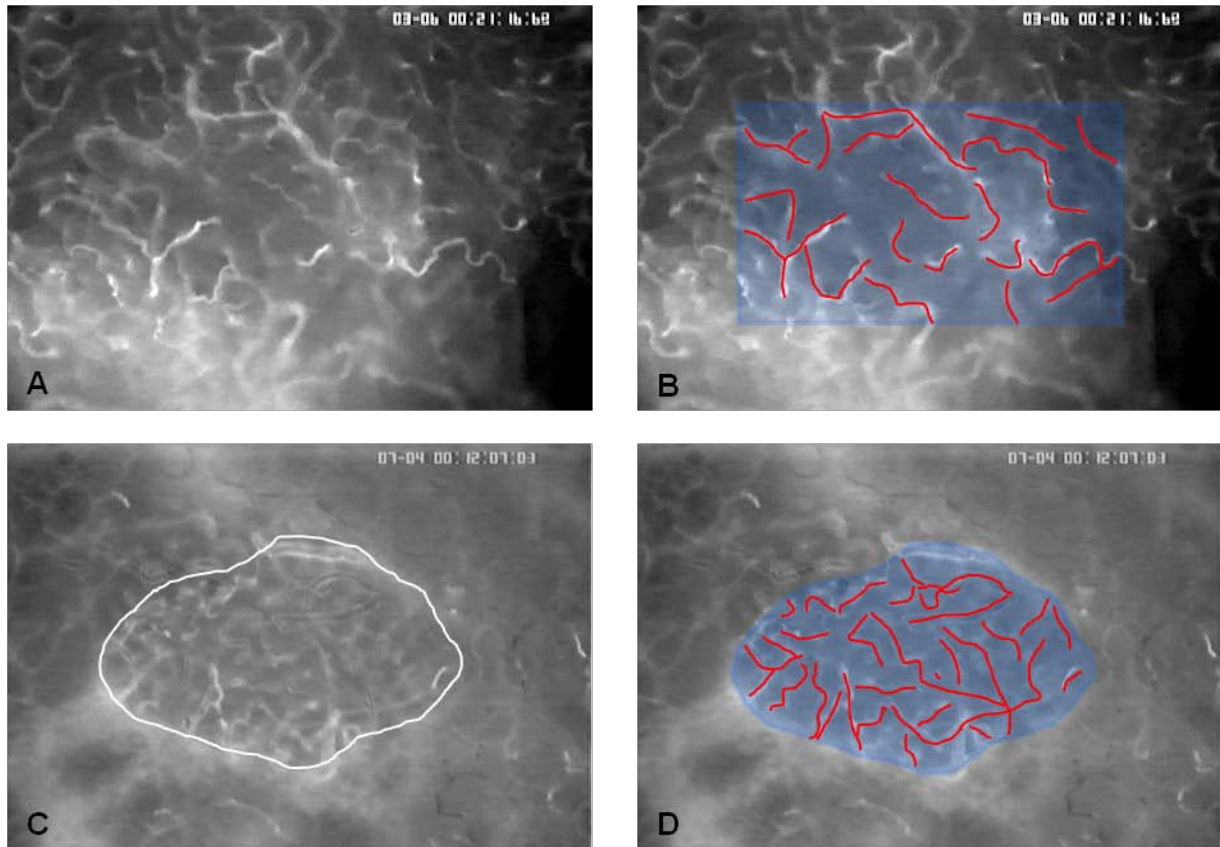


Abbildung 8: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen der Pankreasmikrozirkulation des exokrinen (A) und endokrinen (C) Pankreas nach Kontrastierung des Plasmas mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran. Die Mikrozirkulation randomisiert eingestellter Gesichtsfelder und Inseln wurde für 30s auf Videoband aufgezeichnet. Durch softwaregestützte Nachzeichnung der Kapillaren (B und D) kann die jeweilige FCD des Gesichtsfeldes bestimmt werden, wobei gilt: $FCD = \text{Länge der nachgezeichneten Kapillaren in cm (rot)} / \text{Fläche in } \text{cm}^2 \text{ (blau)}$.

5.3.2.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Quantifizierung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion als Indikator einer inflammatorischen Antwort erfolgte nach intravenöser Applikation von 0,1ml 1% Rhodamin-6G. Dieser Fluoreszenzfarbstoff färbt Zellen an, indem er in die Mitochondrien und Zellkerne interkaliert (Horobin et al. 1990; Baatz et al. 1995). Dabei werden insbesondere die Mitochondrien in Granulozyten und Makrophagen in

Abhängigkeit von deren Membranpotential angefärbt. Die Beobachtung der Interaktion der Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel erfolgte in postkapillaren Venolen des Pankreas mit einem Gefäßdurchmesser von 25-80µm und einer Länge von ca. 100µm. Neben der Erfassung der adhärenenten Leukozyten („Sticker“) erfolgte parallel die Differenzierung der Anzahl frei fließender und am Endothel entlang rollender Leukozyten. Jeder Gefäßabschnitt wurde über einen Beobachtungszeitraum von 30s aufgenommen. Während frei fließende Zellen den untersuchten Gefäßabschnitt ohne Interaktion mit der Gefäßwand passierten, wurden Zellen als rollend definiert, die eine durch das Gefäß gelegte Linie mit einer Geschwindigkeit von nur 2/5 der mittleren Blutfließgeschwindigkeit passierten (Roller). Die Anzahl der rollenden Leukozyten wurde als prozentualer Anteil der gesamt fließenden Leukozyten pro untersuchtem Gefäßsegment angegeben. Als adhärenent wurden Zellen definiert, die über einen Zeitraum von 20s stationär an der Endotheloberfläche hafteten (Sticker). Die Anzahl fest am Endothel adhärenenter Leukozyten wurde pro untersuchtem Gefäßsegment durch manuelles Auszählen und als Anzahl pro mm² Endotheloberfläche angegeben (Abb. 9). Die Endotheloberfläche wurde aus Gefäßdurchmesser und Länge des untersuchten Segments berechnet, wobei eine zylindrische Geometrie des entsprechenden Gefäßabschnittes angenommen wurde.

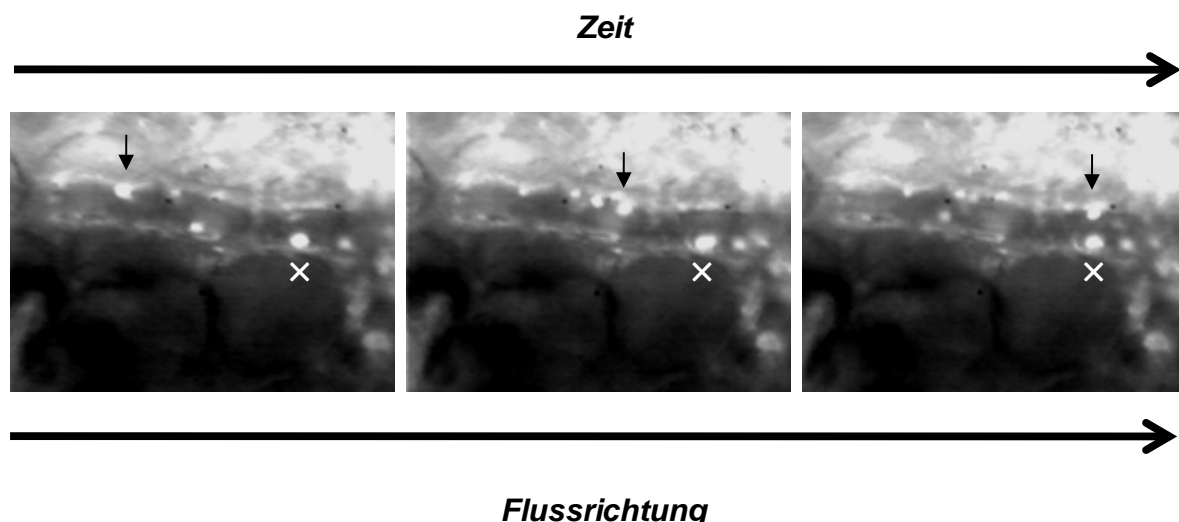


Abbildung 9: Intravitalmikroskopische Aufnahme einer postkapillaren Venole des exokrinen Pankreas nach Anfärbung der Leukozyten mit Rhodamin 6G zu den Zeitpunkten $t=0s$ (A), $t=3s$ (B) und $t=6s$ (C). Während sich der adhärenente Leukozyt (x) zu allen Zeitpunkten an derselben Position befindet, bewegt sich der „rollende“ Leukozyt (↓) mit weniger als 2/5 der Blutzellfließgeschwindigkeit am Gefäßendothel entlang.

5.3.2.4 Apoptotische Parenchymschäden des Pankreas

Als Maß für möglicherweise Entzündungs-bedingte akute Schäden des Pankreas wurde des Weiteren die Azinuszell-Apoptose erfasst. Die Visualisierung apoptotischer Zellen erfolgte nach intravenöser Injektion von 1% Bisbenzimid 0,1ml/100g KG. Dieser Farbstoff interkaliert in Adenin- und Thyminreiche Regionen der DNA und färbt so die Zellkerne an. Apoptotische Zellen zeigen charakteristischerweise eine Kondensation, Fragmentation und halbmondförmige Formation des Chromatins, die in der Folge zu einer unterschiedlichen Anfärbung der Zellkerne führt (Eipel et al. 2004). Nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs können diese Kontraste und kernmorphologische Differenzen zwischen apoptotischen und gesunden Zellen erkannt werden. Um die Anzahl der in Apoptose befindlichen Zellen zu quantifizieren, wurden pro Versuch in randomisierter Abfolge zehn Gesichtsfelder in 500facher Vergrößerung erfasst und aufgenommen. In der späteren offline Auswertung wurde die Zahl apoptotischer Zellen pro cm² erfasst.

5.3.3 HÄMATOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

5.3.3.1 Postoperative Labordiagnostik

Am Ende der intravitalmikroskopischen Untersuchung wurde den Tieren aus der Vena cava Blut entnommen und ein Differentialblutbild mittels eines automatischen Zellzählers (Sysmex KX21, Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland) erstellt und als Parameter die Zahl der Erythrozyten, der Leukozyten, der Thrombozyten, der Hämatokrit und das Hämoglobin erfasst. Weiterhin wurde das nach Zentrifugation gewonnene Serum unter Zuhilfenahme eines Maus-spezifischen ELISA auf ANA untersucht (ANA ELISA kit 5210, Alpha Diagnostics international, San Antonio, USA). Das verbleibende Serum wurde bei minus 20°C asserviert.

5.3.3.2 Repetitive Blutentnahme

Bis zum Operationszeitpunkt wurde den Tieren repetitiv in 14-tägigen Abständen retrobulbär Blut entnommen. Die Tiere wurden zunächst durch Äther narkotisiert und das Gewicht erfasst. Unter Zuhilfenahme einer Glaskapillare wurden ca. 200 µl Blut gewonnen. Der Glucosegehalt des Frischblutes wurde unmittelbar durch ein Blutzuckermessgerät festgestellt (mmol/l). Nach Zentrifugation wurde das Plasma auf die Parameter Lipase, Amylase und Alkalische Phosphatase durch ein spektrometrisches Analysesystem (Cobas CIII, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) untersucht.

5.3.4 HISTOMORPHOLOGIE

5.3.4.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Nach der postoperativen Blutentnahme wurde eine Pankreatektomie durchgeführt. Nach der Entnahme des Organs wurde es entlang seiner Längsachse in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde in 4% Formalinlösung für drei Tage fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Fertigstellung und Färbung der Schnitte erfolgte am Institut für Pathologie der Universität Rostock (Prof. Dr. H. Nizze). Von den eingebetteten Paraffin-Blöcken wurden 2 µm dicke Schnittpräparate angefertigt und diese unter Verwendung der Farbstoffe Eisenhämatoxylin und Eosin G (HE) angefärbt. Die HE-Färbung ist eine konventionelle Übersichtsfärbung zur Darstellung von Geweben. Die Zellkerne erscheinen im Lichtmikroskop dunkelrot-violett, das Zytoplasma und proteinhaltige Lösung rosa. Zu Beginn der Färbung wurden die Präparate für die Darstellung saurer Moleküle für 4 min in Hämalun gefärbt, daran schlossen sich ein 10-minütiges Bläuen in warmem Leitungswasser und eine 20-sekündige Färbung in Eosin (0,5%) an. Überschüssiges Eosin wurde durch Abspülen in Aqua dest. eliminiert. Daraufhin wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt (70%, 96%, 100% Alkohol). Zum Ende der Färbung wurden die Präparate des Pankreas in Xylol inkubiert und abschließend mit Pertex eingedeckt.

5.3.4.2 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung erfolgte am Institut für Pathologie der Universität Rostock unter Anleitung von Prof. Dr. H. Nizze. Die Schnittpräparate wurden anhand eines standardisierten histologischen Scores ausgewertet. Je nach Schweregrad der Pankreas-Parenchymschäden erfolgte eine Bewertung der Schnitte zwischen 0 und 4 (Tab. 4). Als erkrankt wurde ein Tier betrachtet, wenn es mindestens einen histopathologischen Score von größer oder gleich 2 hatte.

Score der Autoimmunpankreatitis	Histomorphologie
0	Pankreasparenchym ohne Zellinfiltration, Gewebsmorphologie und Organintegrität intakt.
1	Vereinzelte Zellinfiltrationen ins Pankreasparenchym, keine Gewebsläsionen.
2	Zellinfiltration ins Pankreasparenchym, fokale Gewebsläsionen geringen Ausmaßes.
3	Massive Zellinfiltration, diffuse Parenchymschädigung mit verbleibendem intaktem Gewebe.
4	Massive Zellinfiltration, das gesamte exokrine Pankreasgewebe ist in seiner Architektur gestört oder durch Fettgewebe ersetzt, nur endokrines Gewebe verbleibend.

Tabelle 4: Histopathologischer Score der Autoimmunpankreatitis nach Kanno et al. 1992

5.3.5 IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden im gastroenterologischen Forschungslabor der Universität Rostock unter Anleitung von Prof. Dr. R. Jaster durchgeführt. Für die Untersuchungen auf CD4⁺-, CD8⁺-, CD11b⁺- und CD138⁺-Zellen wurden aus den in Paraffin eingebetteten Gewebestücken zunächst 4µm dicke Schnittpräparate angefertigt. Diese wurden auf Poly-Lysin beschichteten

Objekträgern fixiert und zur Antigen-Demaskierung in der Mikrowelle behandelt. Danach wurden die Schnitte bei 4°C für 18h mit den jeweils zu untersuchenden Primär-Antikörpern inkubiert (für CD4: monoklonale Ratten Anti-CD4 (RM 4-5), 1:100, (Abcam, Cambridge, UK), für CD8: monoklonale Ratten CD8-IgM, 1:100, (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), für CD11b: Monoklonale Ratten Anti-CD11b (M1/70.15), 1:100, (Abcam) und für CD138: Monoklonale Anti-CD138 IgG, 1:500, (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)). Im Anschluss wurden die Schnitte mit einem Sekundärantikörper (Anti-Ratten-Mäuseantikörper, 1:200, Santa Cruz Biotechnology) für 30min inkubiert. Um die Antikörperbindung sichtbar zu machen, wurde Fuchsin (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) als Chromogen verwendet und die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die CD4⁺-, CD8⁺-, CD11b⁺-, CD138⁺-Zellen wurden lichtmikroskopisch bei 40facher Vergrößerung ausgezählt und sind in Zellen pro Quadratmillimeter angegeben.

5.3.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden im gastroenterologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock unter Leitung von Prof. Dr. R. Jaster durchgeführt. Zur Analyse der RNA wurden die in flüssigem Stickstoff asservierten Pankreata zunächst homogenisiert und dann die vollständige RNA unter Zuhilfenahme der Guanidinium-Thiocyanate/Phenol-Methode nach Sparmann gewonnen (Sparmann et al. 1997). Die RNA wurde dann durch eine Reverse Transkriptase (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Foster City, CA) unter zufallsbedingtem Hexamer Priming in cDNA überführt. Die Vervielfältigung der zu untersuchenden cDNA erfolgte durch quantitative Real-Time PCR, wobei ein TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems) zum Einsatz kam. Die darauffolgende fluoreszenzabhängige Bestimmung der cDNA Menge erfolgte durch ein Maus-Gen spezifisches „Assay on Demand“ in einem ABI 7000 Prim Sequenz Detektions System (Applied Biosystems). Untersucht wurden folgende Parameter: Mm00801778_m1 (IFN-), Mm00434228_m1 (IL1), Mm00434256_m1 (IL2) und Mm00446190_m1 (IL6). Das Protokoll der PCR gestaltete sich wie folgt: 95°C für 10 min, 50 Zyklen im Wechsel zwischen 1min 60°C und 15s 95°C. Als House-Keeping-Kontroll-Gen diente die Glyceraldehyde-3-

phosphate Dehydrogenase (GAPDH), welche in einen Kontrollansatz gemessen wurde (TaqMan rodent GAPDH control reagents, Applied Biosystems). Diese PCR-Reaktionen wurden in einem Dreifachansatz durchgeführt. Die relative Expression der einzelnen mRNAs im Vergleich zur Expression der GAPDH ergab sich aus der Gleichung $\Delta Ct_{\text{Beispiel}} = C_{\text{mRNA}} - C_{\text{GAPDH}}$. Für die weitere Berechnung wurde der Parameter mit dem geringsten ΔCt , also die am stärksten exprimierte mRNA, als Referenzwert herangezogen. Die relative Menge der Ziel-mRNA in den einzelnen Beispielen wurde entsprechend $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ dargestellt, wobei $\Delta\Delta Ct_{\text{Beispiel}} = \Delta Ct_{\text{Beispiel}} - \Delta Ct_{\text{Referenz}}$ gilt.

5.4 EXPERIMENTELLES PROTOKOLL

5.4.1 VERSUCHSGRUPPEN

Insgesamt wurden 90 MRL/MpJ Mäuse, von denen 45 Tiere weiblichen und 45 Tiere männlichen Geschlechts waren, untersucht. Die Tiere waren in vier Gruppen eingeteilt, wobei die Tiere der Gruppe 1 im Alterszeitraum von 8-12 Wochen untersucht wurden, Gruppe 2 von 16-20 Wochen, Gruppe 3 von 24-28 und Gruppe 4 von 32-40 Wochen (Abb. 10). Allen Tieren wurde, bis sie ihr jeweiliges Operationsalter erreicht hatten, repetitiv in 14-tägigen Abständen Blut entnommen.

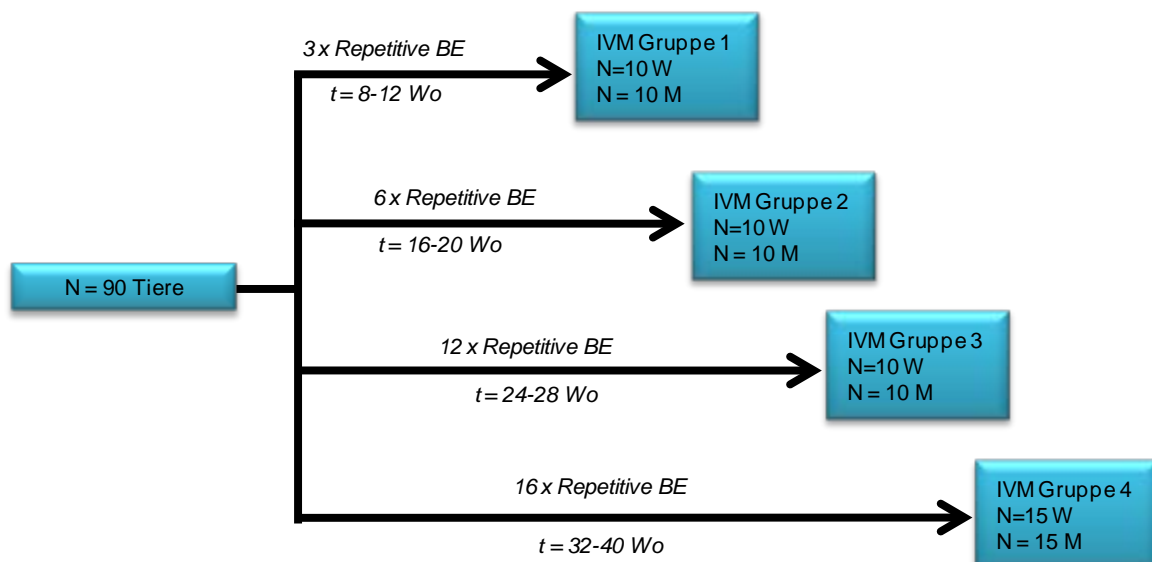


Abbildung 10: Insgesamt wurden 90 MRL/MpJ Mäuse untersucht (45 weibliche (W)/45 männliche (M)). Die Tiere waren in vier Gruppen eingeteilt, wobei allen Tieren bis zum jeweiligen Operationsalter repetitiv in 14-tägigen Abständen Blut entnommen wurde (BE). Die Tiere der Gruppe 1 wurden im Alterszeitraum von 8-12 Wochen, der Gruppe 2 von 16-20 Wochen, der Gruppe 3 von 24-28 Wochen und der Gruppe 4 von 32-40 Wochen untersucht.

5.4.2 VERSUCHSABLAUF

Vor Operationsbeginn wurden die Tiere mit Ketamin/Xylazin (90/25mg/kg i.p.) narkotisiert. Anschließend wurden die Tiere gewogen, bauchseitig und am Hals rasiert und in Rückenlage fixiert. Um die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur zu gewährleisten, wurden die Tiere durch eine elektronisch geregelte Heizplatte während der gesamten Untersuchung gewärmt. Anschließend wurde den Tieren ein Jugulariskatheter gelegt und das Pankreas, wie oben beschrieben, mikrochirurgisch präpariert und ausgelagert. Die Gabe der Fluoreszenzfarbstoffe und die IVM Untersuchung wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt:

1. I.v. Applikation von 0,1ml 2% FITC markiertem Dextran.
2. IVM Aufnahme von acht Gesichtsfeldern (Blaufilter) in 200facher Vergrößerung zur Auswertung der nutritiven kapillaren Perfusionsdichte und kapillaren Blutzellfließgeschwindigkeit.
3. I.v. Applikation von 0,1ml 1% Rhodamin 6G und 1% Bisbenzimid (0,1ml/ 100g KG).
4. IVM Aufnahme postkapillarer Venolen (Grünfilter) zur Auswertung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und der Blutzellfließgeschwindigkeit in postkapillaren Venolen (Blaufilter).
5. IVM Aufnahme von zehn Gesichtsfeldern in 500facher Vergrößerung zur späteren Auswertung der Azinuszellapoptose (UV-Filter).
6. IVM Aufnahmen des endokrinen Gewebes zur späteren Auswertung der FKD und Blutzellfließgeschwindigkeit des endokrinen Gewebes (Blaufilter).

Am Ende der IVM Untersuchung wurde den Tieren aus der Vena cava ca. 1ml Blut entnommen und ein Differentialblutbild erstellt. Abschließend erfolgte eine Pankreatektomie. Durch i.v. Gabe einer Überdosis Ketamin wurden die Tiere am Ende der Untersuchung getötet.

5.5 STATISTIK

Alle Daten werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) angegeben. Dabei rekrutieren sich die Mittelwerte der einzelnen mikrozirkulatorischen Parameter aus den Einzelwerten untersuchter Gefäße pro Tier und Versuchsgruppe. Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels „one way analysis of variance“ (ANOVA) gefolgt vom Student's T-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Signifikante Unterschiede von Werten innerhalb einer Gruppe wurden mit Hilfe des gepaarten Student's t-test und Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen geprüft. Falls eine Normalverteilung der Werte ausgeschlossen werden konnte, erfolgte der Gruppenvergleich mit Kruskal Wallis Varianzanalyse und der paarweise Vergleich mit dem Mann-Whitney Rang Summen Test. Entsprechend wurden signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe durch die Friedman Rangvarianz Analyse, gefolgt vom Wilcoxon Paar Test mit Korrektur des alpha-Fehlers für statistische Berechnungen bei Messwiederholungen bestimmt. Sämtliche statistische Tests erfolgten unter Verwendung der Software SigmaStat 3.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Bei der Prüfung wurden Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

6. ERGEBNISSE

6.1 MIKROVASKULÄRE PERFUSION DES PANKREAS

Die Autofluoreszenz des Pankreasgewebes ermöglicht eine Darstellung des mikrovaskulären Netzwerkes bereits vor intravenöser Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran. Während sich das mikrovaskuläre Netzwerk des Pankreas vor Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen im „Negativ“-Kontrast darstellt, also die Gefäße dunkel erscheinen, stellen sich die Gefäße nach Anfärbung des Plasmas mit FITC-Dextran hell dar (Abb. 11). Nach Anfärbung kann das intrapankreatische Gefäßnetzwerk, bestehend aus Arteriolen, Kapillaren, postkapillaren Venolen und Venolen, sowohl des exokrinen als auch des endokrinen Anteils, einzeln visualisiert und aufgezeichnet werden.

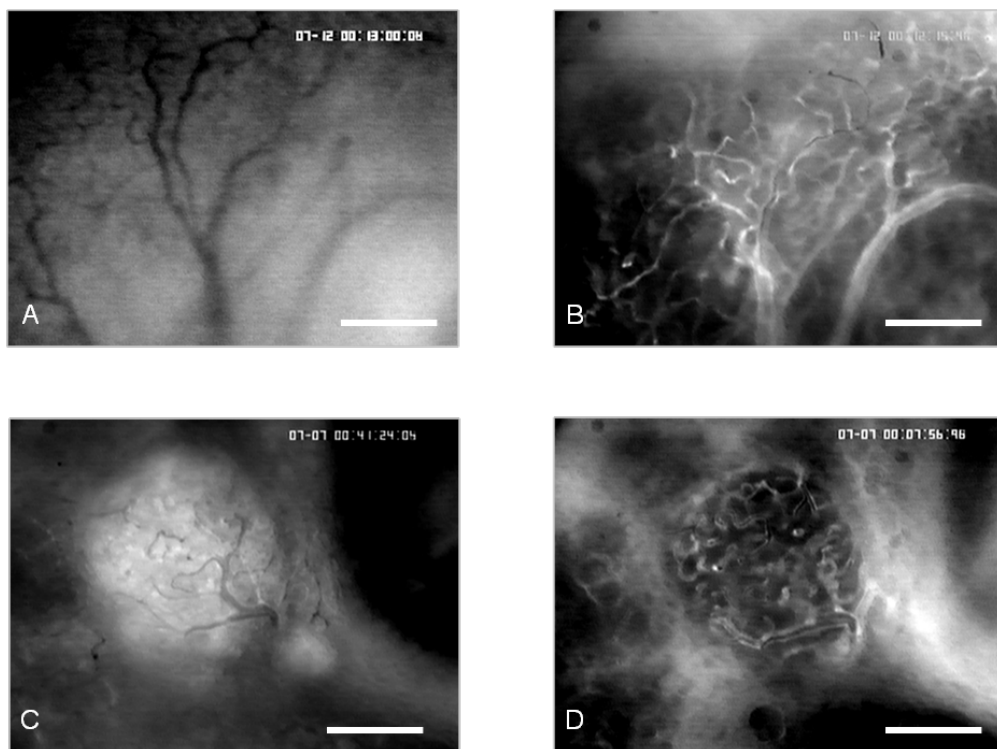


Abbildung 11: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen der Mikrozirkulation des exokrinen (A und B) und des endokrinen (C und D) Pankreas vor (A und C) und nach (B und D) Anfärbung des Plasmas mit FITC-Dextran. Maßstab=100µm.

Anhand der gewonnenen Aufnahmen können Aussagen über die FKD sowie über die Blutzellfließgeschwindigkeit in Kapillaren und postkapillaren Venolen des exokrinen und endokrinen Pankreas getätigt werden. Für Tiere, die in der histopathologischen Untersuchung mit einem Score von null bewertet wurden, also als gesund zu betrachten waren, ergaben sich folgende Werte (Tab. 5).

Parameter	Exokrines Pankreas	Endokrines Pankreas
FKD (cm/cm ²)	433±1	634±11
Kapillare Blutzellfließgeschwindigkeit (µm/s)	555±70	1100±590
Venuläre Blutzellfließgeschwindigkeit (µm/s)	1200±280	1310±160

Tabelle 5: Durchschnittliche Werte mikrozirkulatorischer Parameter des exokrinen und endokrinen Pankreas in gesunden Tieren der jüngsten Untersuchungsgruppe (8-12 Wochen), welche intravitalmikroskopisch eine intakte Mikrozirkulation aufwiesen und histopathologisch mit dem Score 0 bewertet wurden.

6.2 INFLAMMATION

6.2.1 LEUKOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTION

Inflammation in einem Organ ist durch Akkumulation von Leukozyten und deren Interaktion mit dem Gefäßendothel charakterisiert. Die pankreatische Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den postkapillaren Venolen konnte nach i.v.-Injektion von Rhodamin 6G beurteilt werden. Dabei wurde zwischen sich frei bewegenden Leukozyten, Rollern und Stickern unterschieden (Abb. 12A-D). Intravitalmikroskopisch konnte eine signifikante alters- und geschlechtsabhängige Zunahme der intrapankreatischen Leukozyten-Akkumulation in der MRL/Mp-Maus gezeigt werden (Abb. 12F). Die Inflammation in männlichen Tieren ist deutlich geringer ausgeprägt als in weiblichen Tieren und ist nicht vom Alter abhängig. Eine Beziehung konnte auch zwischen dem postoperativ erfassten histopathologischen Score und der intravitalmikroskopisch erfassten Leukozyten-Akkumulation festgestellt werden (Abb. 12E). Tiere mit ausgeprägterer intrapankreatischer Leukozyten-Akkumulation wiesen auch bei der histopathologischen Untersuchung ausgeprägtere Gewebepathologien auf.

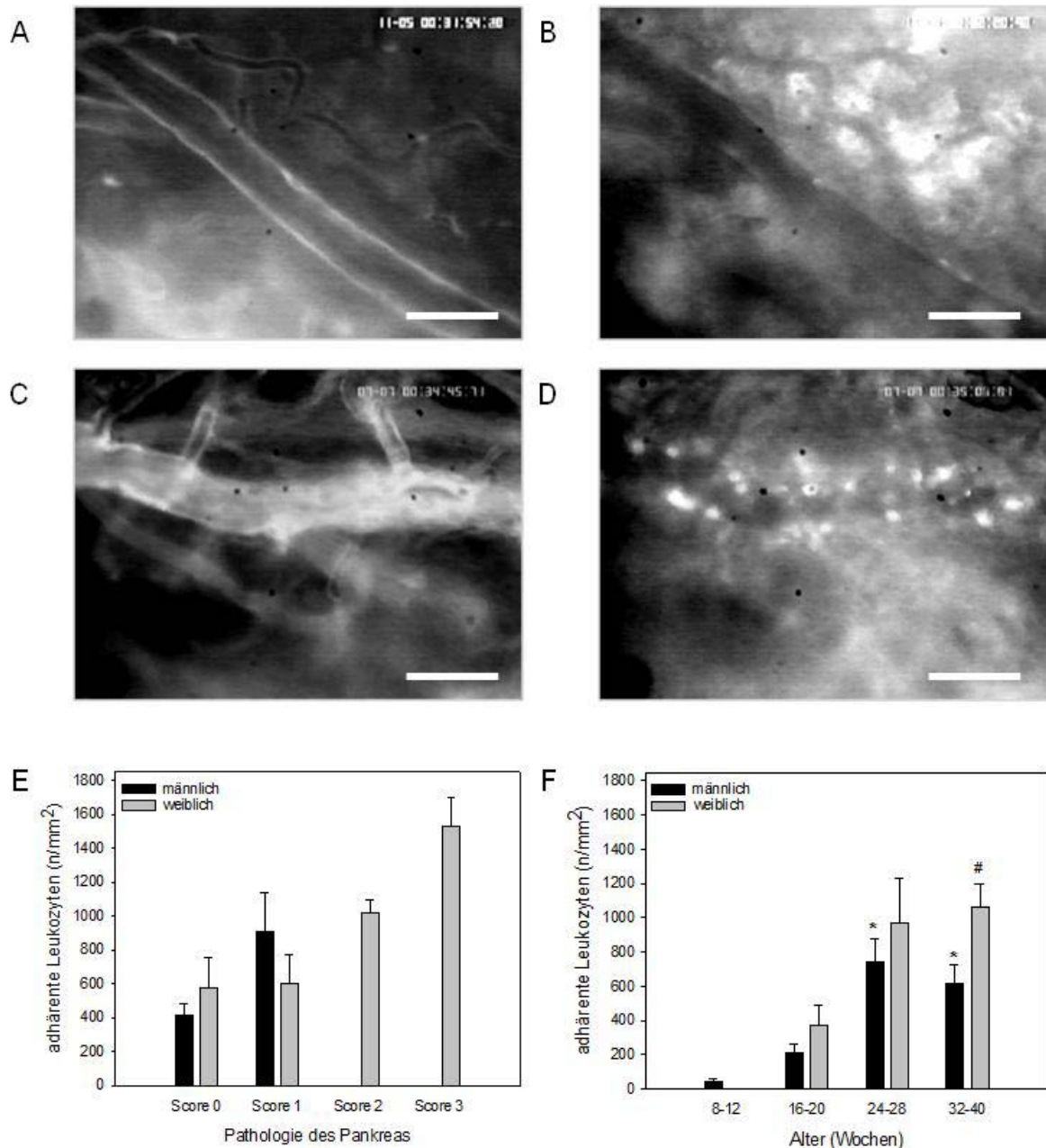


Abbildung 12: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen einer postkapillaren Venole je eines Tieres der Altersgruppe 8-12 Wochen (A und B) und eines Tieres der Altersgruppe 24-32 Wochen (C und D). Nach Anfärbung des Plasmas mit FITC-Dextran und Rhodamin 6G kann die Mikrozirkulation in den Venolen durch Blaulicht Epi-Illumination (A und C) und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion durch Grünlicht Epi-Illumination (B und D) visualisiert und aufgezeichnet werden. In der Offline-Analyse erfolgt eine Quantifizierung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (E und F), wobei Leukozyten als adhärenz klassifiziert wurden, wenn sie sich im Beobachtungszeitraum von 30s nicht am Gefäßendothel entlang bewegten. Die Zahl der Leukozyten ist n/mm^2 angegeben. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; ANOVA, Holm-Sidak; * $p < 0,05$ vs. männliche Tiere 8-12 Wochen; # $p < 0,05$ vs. männliche Tiere 32-40 Wochen. Maßstab=100 μm .

Auch für die Zahl der rollenden Leukozyten ergab sich eine deutliche Zunahme mit steigendem pathologischen Score (Abb. 13A) und steigendem Alter der Tiere (Abb. 13B).

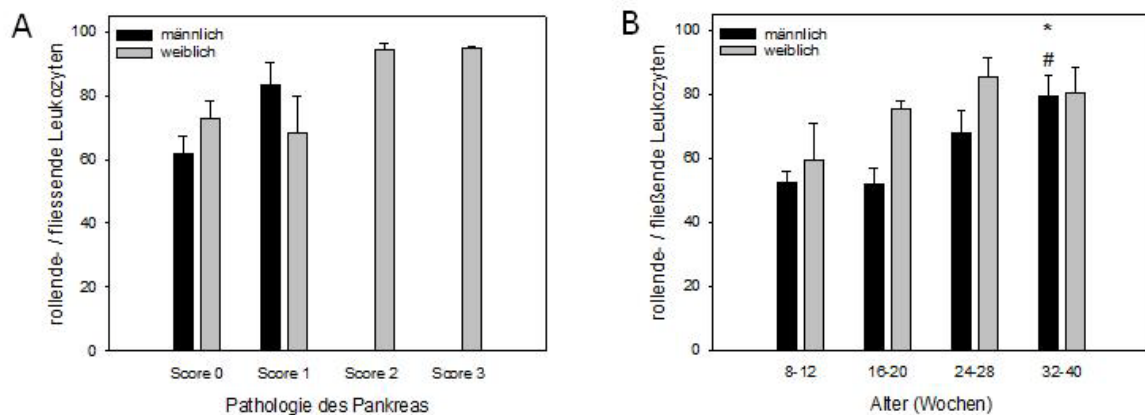


Abbildung 13: Die Zahl rollender Leukozyten in Abhängigkeit des pathologischen Scores (A) und dem Alter der Tiere (B). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; ANOVA, * $p < 0.05$ vs. männliche Tiere 8–12 Wochen; Holm-Sidak # $p < 0,05$ vs. männliche Tiere 16–20 Wochen.

6.2.2 FUNKTIONELLE KAPILLARE DICHTEN

Als Korrelat eines inflammatorischen Prozesses kommt es zu Störungen der Mikrozirkulation, welche sich morphologisch in einer fehlenden Perfusion einzelner Kapillaren und in einer Rarefizierung des Gefäßnetzwerkes darstellt (Abb. 14A und B) Maß der inadäquaten Perfusion ist die Abnahme der FKD. Konnte altersabhängig nur eine geringe Abnahme der FKD in weiblichen Tieren der Gruppe 4 festgestellt werden (Abb. 14D), so zeigten Tiere, die intravitalmikroskopisch erniedrigte Werte für die FKD aufwiesen, erwartungsgemäß auch später in der histopathologischen Untersuchung pathologische Veränderungen (Abb. 13C).

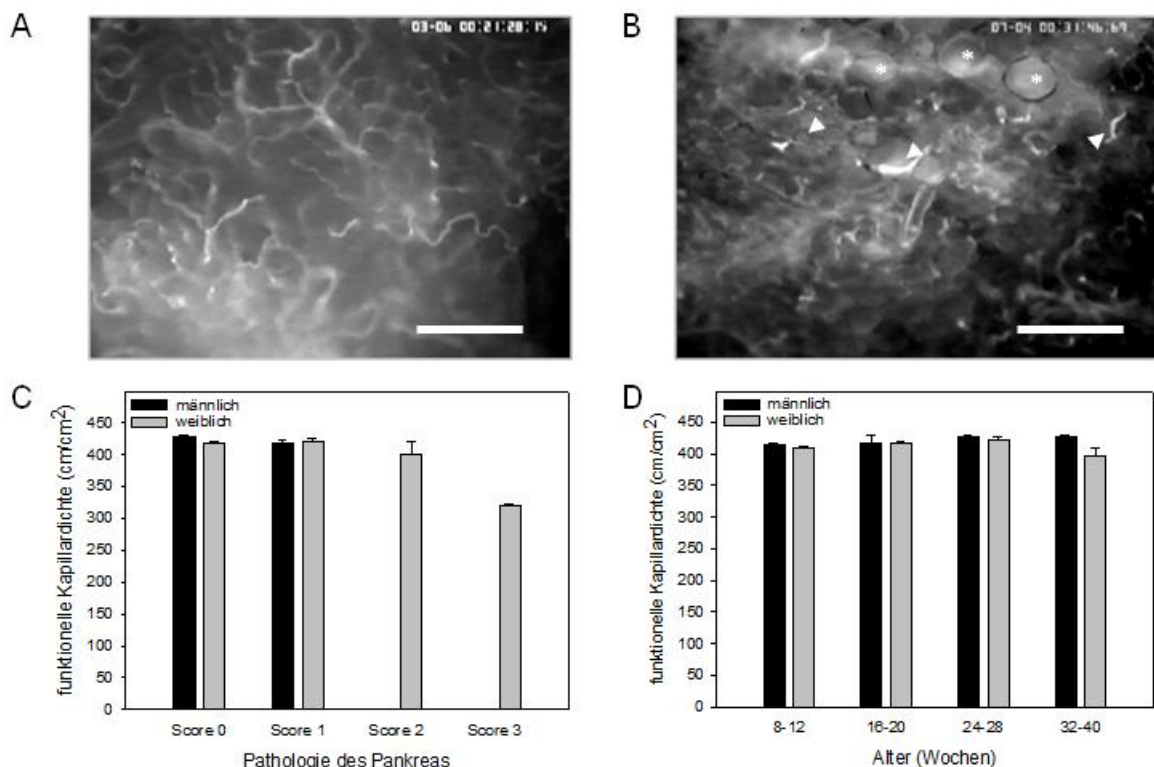


Abbildung 14: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen der Mikrozirkulation eines jungen Tieres (8-12 Wochen) mit intakter Mikrozirkulation (A) und eines alten Tieres (32-40 Wochen) mit gestörter Mikrozirkulation (B) sowie die quantitative Analyse der FKD in Bezug zum histopathologischen Score (C) und zum Alter der Tiere (D). Insbesondere in weiblichen Tieren der ältesten Gruppe konnten Perfusionsausfälle (►) und fettige Degenerationen (*) festgestellt werden. Maßstab=100µm; Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

6.2.3 KAPILLARE UND VENULÄRE BLUTZELLFLIESSGESCHWINDIGKEIT

Mit der Störung der Mikrozirkulation kann auch eine Zunahme oder Abnahme der kapillaren und venulären Blutzellfließgeschwindigkeit einhergehen. Zeigte sich bei Tieren der Gruppe 2 (16-20 Wochen) noch eine leichte Zunahme der kapillaren Fließgeschwindigkeit gegenüber Gruppe 1 (8-12 Wochen), so nahm die Fließgeschwindigkeit in Gruppe 3 (24-28 Wochen) und Gruppe 4 (32-40 Wochen) gegenüber Gruppe 2 wiederum ab (Abb. 15A). Des Weiteren zeigte sich eine deutliche Abnahme der kapillaren Blutzellfließgeschwindigkeit mit zunehmendem histopathologischen Score (Abb. 15B). So zeigen weibliche Tiere mit einem pathologischen Score von 0 eine durchschnittliche Blutzellfließgeschwindigkeit in

Kapillaren von $550 \pm 10 \mu\text{m/s}$. Bei weiblichen Tieren mit einem pathologischen Score von 3 sank dieser Wert auf $380 \pm 10 \mu\text{m/s}$.

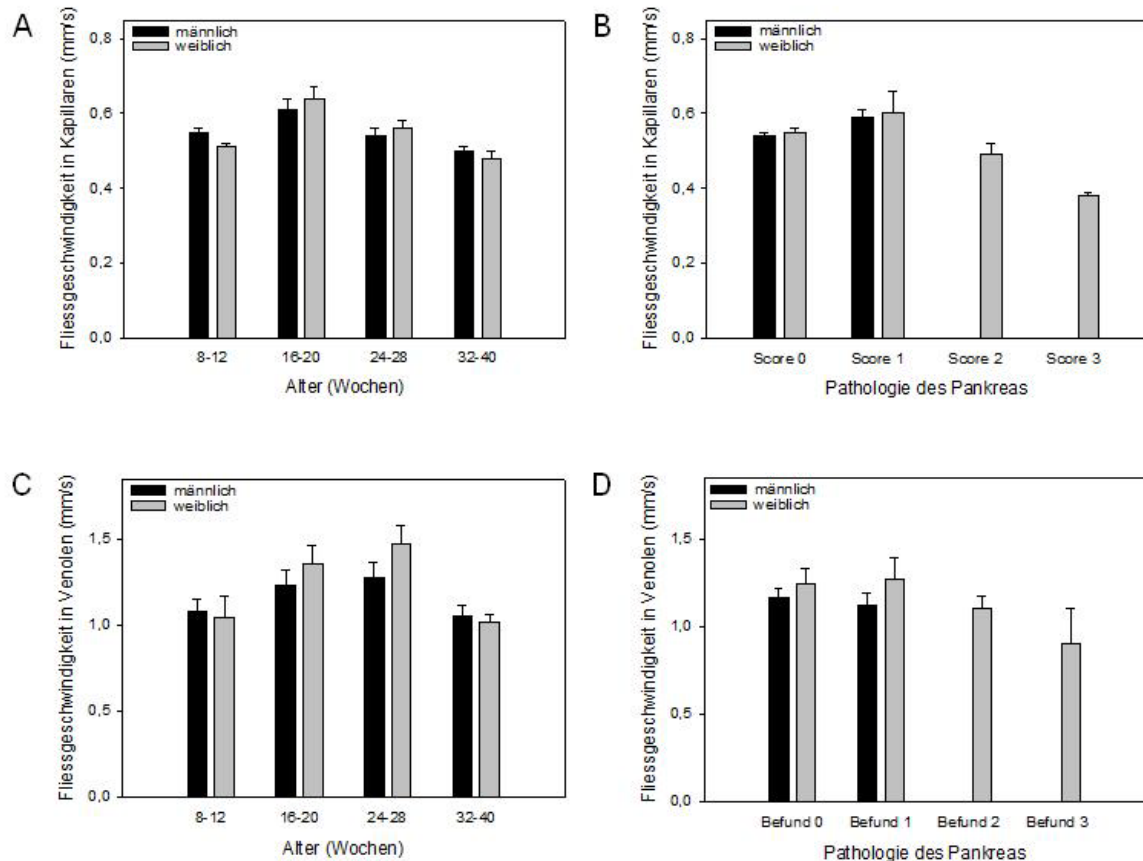


Abbildung 15: Blutzellfließgeschwindigkeit in Kapillaren (A und B) und Venolen (C und D) in Abhängigkeit des pathologischen Scores (A und C) und des Alters der Tiere (B und D). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Die Blutzellfließgeschwindigkeit in Venolen steigt von etwa $1000 \mu\text{m/s}$ bei jungen Tieren (8-12 Wochen) bis auf etwa $1500 \mu\text{m/s}$ (24-28 Wochen). Bei den ältesten Tieren reduziert sich diese wieder auf Werte von etwa 1 mm/s (Abb. 15C). Auch die Blutzellfließgeschwindigkeit in Venolen sinkt mit ansteigendem Pathologie-Score. So zeigten weibliche Tiere, welche einen pathologischen Score von 0 aufwiesen eine Blutzellfließgeschwindigkeit von durchschnittlich $1300 \pm 100 \mu\text{m/s}$. Bei Tieren mit einen pathologischen Score von 3 sank dieser Wert auf durchschnittlich $900 \pm 200 \mu\text{m/s}$ (Abb. 15D).

6.2.4 APOPTOTISCHE ZELLSCHÄDEN

Im Rahmen akuter toxischer Parenchymschäden können apoptotische Zelluntergänge durch die Intravitalmikroskopie visualisiert werden. Die Zahl der apoptotischen Zelluntergänge lag in allen Altersgruppen unter 5 Zellen/mm². Des Weiteren waren zwischen männlichen und weiblichen Tieren keine Unterschiede festzustellen.

6.3 HISTOPATHOLOGIE

6.3.1 HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dient als Übersichtsfärbung zur Darstellung des exokrinen und endokrinen Pankreas. Eine Differenzierung zwischen endokrinem und exokrinem Gewebe ist schon bei kleinen Vergrößerungen möglich. Die Zellen des exokrinen Pankreas sind aufgrund ihrer stark eosinophilen Zymogengranula stark angefärbt, die Zellkerne liegen basal. Die Langerhans'schen Inseln wirken dagegen aufgehellt und finden sich in räumlicher Beziehung zu größeren Gefäßen (Abb. 17B).

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Schnittpräparate des Pankreas nach HE-Färbung erfolgten anhand eines histopathologischen Scores von 0-4, wobei eine AIP bei einem Score ≥ 2 diagnostiziert wurde. Bei der Auswertung der HE-Schnittpräparate der asservierten Pankreata ergaben sich alters- und geschlechtsabhängige Veränderungen des exokrinen Pankreasparenchyms. Interessanterweise konnten diese Unterschiede im endokrinen Pankreas nicht festgestellt werden. Die Langerhans'schen Inseln blieben in allen untersuchten Altersstufen sowie bei männlichen und weiblichen Tieren über den gesamten Untersuchungszeitraum unauffällig. In der Gruppe der 8-12 Wochen alten Tiere zeigten weder männliche noch weibliche Tiere pathomorphologische Veränderungen und wurden allesamt mit einem Score von 0 bewertet. Die weiblichen Tiere zeigten mit zunehmendem Alter deutliche Veränderungen des Pankreas, wie z.B. massenhafte Leukozyteninfiltration, Rarefizierung des Parenchyms und eine zunehmende fettige Degeneration des Gewebes. Von insgesamt 43 untersuchten weiblichen Tieren konnte bei 9 Tieren

eine AIP diagnostiziert werden (Score ≥ 2), was einer Inzidenz von 21% entspricht. Die Inzidenz stieg mit zunehmendem Alter. Konnte bei Tieren im Alter von 8-20 Wochen keine AIP diagnostiziert werden, zeigten Tiere im Alterszeitraum von 24-28 Wochen eine Inzidenz von 20% und im Alterszeitraum von 32-40 Wochen eine Inzidenz von 54% (Abb. 16A). Bei männlichen Tieren konnte auch in höherem Alter keine AIP (Score ≥ 2) diagnostiziert werden. Nur bei wenigen Tieren wurden leukozytäre Infiltrate nachgewiesen und somit ein pathologischer Score von 1 ermittelt (Abb. 16B).

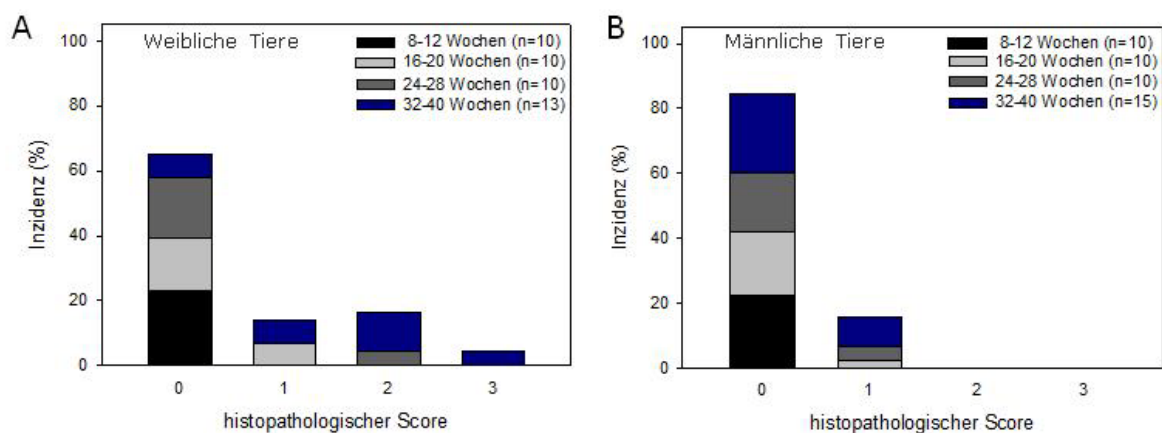


Abbildung 16: Die vier Altersgruppen weiblicher (A) und männlicher (B) Tiere aufgeteilt nach der jeweiligen Häufigkeit ihres histopathologischen Scores. Als AIP wurde ein Score >1 gewertet.

Legt man den durchschnittlichen Score pro Gruppe zugrunde (Abb. 17A), so ergibt sich für weibliche Tiere im Alter von 32-40 Wochen ein Wert von $1,5 \pm 0,3$ und für männliche Tiere ein Wert von $0,2 \pm 0,1$. Weibliche Tiere erkrankten somit signifikant schwerer ($p < 0,05$).

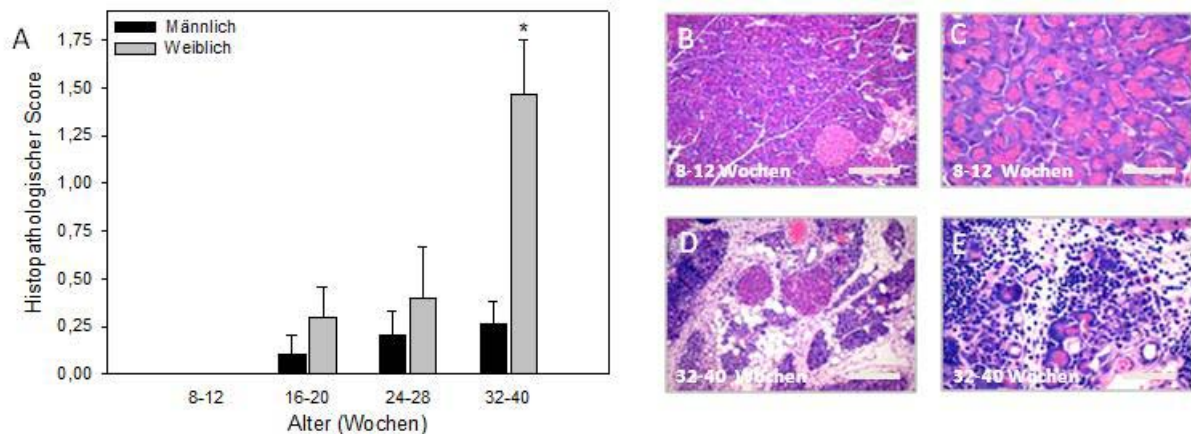


Abbildung 17: Durchschnittlicher histopathologischer Score in Bezug zum Alter der Tiere (A) und repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen HE-gefärbter histologischer Schnittpräparate des Pankreas (B-E). Fand sich bei jungen Tieren eine intakte Morphologie des Pankreasparenchyms (B und C), zeigte sich bei älteren Tieren ein lymphoplasmazelluläres Infiltrat mit fettiger Degeneration des exokrinen Pankreas. Das endokrine Gewebe blieb intakt (D und E). Maßstab=400µm in B und C. Maßstab=140µm in D und E. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; Mann-Whitney Rank Sum test; * $p < 0,05$ vs. männliche Tiere.

6.3.2 IMMUNHISTOLOGIE

Zur genauen Charakterisierung des Entzündungsinfiltrates wurden Präparate des Pankreas der ältesten Gruppen (32-40 Wochen) der männlichen und weiblichen Tiere immunhistologisch untersucht. Im Einzelnen wurden Nachweise auf T-Lymphozyten ($CD4^+$ und $CD8^+$), Makrophagen ($CD11b^+$) und Plasmazellen ($CD138^+$) durchgeführt. Für $CD4^+$ -Zellen ergaben sich durchschnittlich 19 ± 5 Zellen/ mm^2 in weiblichen gegenüber 3 ± 2 Zellen/ mm^2 in männlichen Tieren. Weiterhin fanden sich 23 ± 6 $CD8^+$ -Zellen/ mm^2 in weiblichen Tieren gegenüber 2 ± 1 positiven Zellen/ mm^2 in männlichen Tieren und 12 ± 2 $CD11b^+$ -Zellen in weiblichen Tieren gegenüber 3 ± 2 positiven Zellen/ mm^2 in männlichen Tieren. In weiblichen Tieren konnten durchschnittlich 56 ± 16 $CD138^+$ - Zellen/ mm^2 gegenüber 3 ± 2 $CD138^+$ -Zellen/ mm^2 in männlichen Tieren festgestellt werden. Somit bildeten $CD138^+$ -Zellen den größten Anteil des entzündlichen Infiltrates. Alle Entzündungszellen waren in weiblichen Tieren signifikant häufiger als in männlichen Tieren aufzufinden ($p < 0,05$) (Abb. 18).

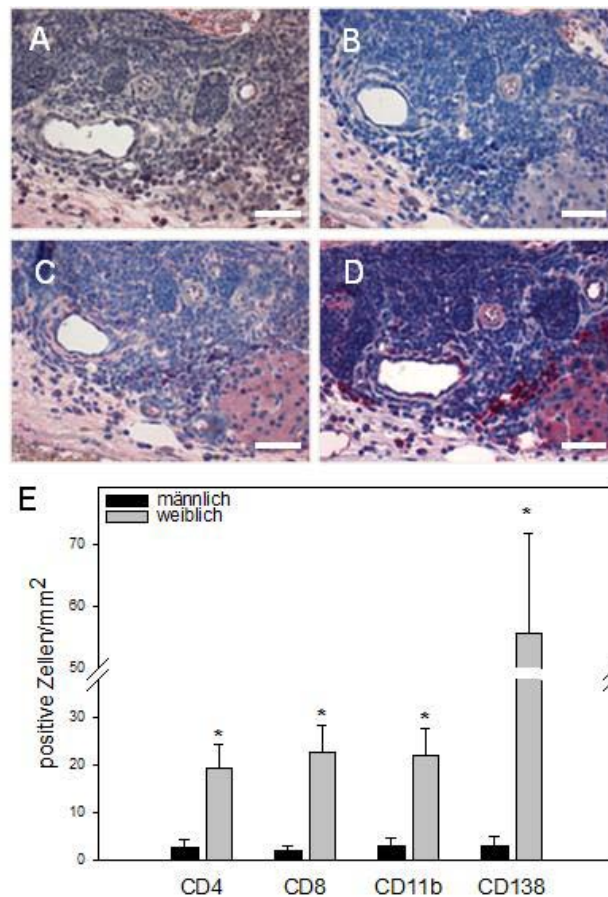


Abbildung 18: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der immunhistologischen Färbungen für $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Lymphozyten (A und B), $CD11b^+$ -Makrophagen (C) sowie $CD138^+$ -Plasmazellen (D). Es erfolgte eine quantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen männlicher und weiblicher Tiere der ältesten Untersuchungsgruppe (32-40 Wochen) (E). Maßstab=70 μ m. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Mann-Whitney Rank Sum test; * $p < 0,05$ vs. männliche Tiere.

6.4 MOLEKULARBIOLOGIE

Im Rahmen von lokaler Inflammation werden spezifische Proteine sezerniert. Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen war es, die mRNA-Level spezifischer inflammatorischer Proteine in männlichen und weiblichen Tieren der ältesten Untersuchungsgruppe (32-40 Wochen) zu vergleichen. Dementsprechend wurde unter Zuhilfenahme der Real-Time-PCR die relative Expression von INF- γ , IL-2, IL-6 und IL-1 β im Verhältnis zum Housekeeping-Gen GAPDH analysiert. Erwartungsgemäß war die Expression der mRNA von INF- γ , IL-1 β , IL-2 und IL-6 in weiblichen Tieren stärker ausgeprägt als in männlichen Tieren (Abb. 19).

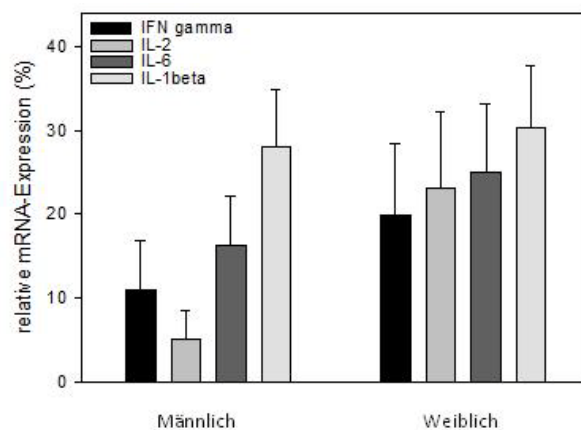


Abbildung 19: Relative Expression der inflammatorischen Gene *INF- γ* , *IL-2*, *IL-6* und *IL-1beta* in weiblichen und männlichen Tieren der ältesten Untersuchungsgruppe (32-40 Wochen). Die Expression der Gene bezieht sich auf das housekeeping Gen *GAPDH*, wobei 100% mRNA Expression dem höchsten ermittelten Wert des jeweiligen Genes in einem Tier entspricht. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

6.5 VOLLBLUT UND SERUMANALYTIK

6.5.1 HÄMATOLOGISCHE PARAMETER

Die nach der Intravitalmikroskopie durchgeführte hämatologische Diagnostik erfolgte an aus der Vena cava entnommenem Blut. Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren ergaben sich physiologische Werte für Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin und den Hämatokrit (Tab. 6).

6.5.2 ELISA

Bei zahlreichen Autoimmunerkrankungen lassen sich Autoantikörper gegen nukleäre Strukturen nachweisen. Das nach Zentrifugation gewonnene Serum wurde daher auf das Vorkommen von ANA untersucht (Abb. 20). In jungen Tieren (8-12 Wochen) konnten keine nachweisbaren Konzentrationen von ANA erfasst werden. Mit zunehmendem Alter zeigten sich jedoch steigende Konzentrationen für ANA in männlichen und weiblichen Tieren. In der ältesten Untersuchungsgruppe (32-40 Wochen) konnten in 10 von 10 weiblichen und in 9 von 10 männlichen Tieren ANA

nachgewiesen werden. Es wurde eine durchschnittlich ANA-Plasmakonzentration von $160 \pm 70 \mu\text{g/ml}$ in weiblichen Tieren und von $77 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ in männlichen Tieren gemessen.

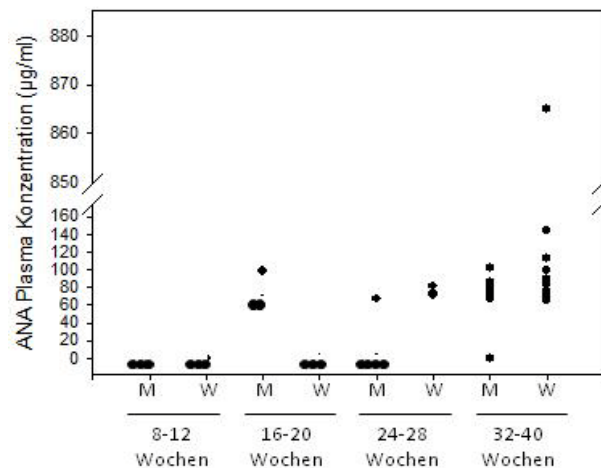


Abbildung 20: Systemische Plasmakonzentration Antinukleärer Antikörper (ANA) der vier Untersuchungsgruppen männlicher (M) und weiblicher (W) Tiere. Angegeben sind die individuellen Werte aller Tiere.

6.5.3 REPETITIVE BLUTENTNAHME

Um einen möglichen labordiagnostischen Hinweis auf den Krankheitsbeginn zu erfassen, wurden die Tiere in 14-tägigen Abständen gewogen und eine Blutentnahme wurde durchgeführt. Um kurze Untersuchungsabstände zu gewährleisten, erfolgte die Blutentnahme bei dem einen Teil einer jeden Gruppe in den geraden Wochen und bei dem anderen Teil einer jeden Gruppe in den ungeraden Wochen. Während des gesamten Beobachtungszeitraums wiesen die Tiere einen guten Allgemeinzustand auf, zeigten keine Veränderung ihrer Ess- oder Trinkgewohnheiten und wiesen bis zum Versuchszeitpunkt eine normale Gewichtsentwicklung auf (Tab. 7). Zur Beurteilung einer möglichen akuten Schädigung des exokrinen Pankreas wurde das entnommene Blut auf die Aktivität der Pankreasenzyme Amylase und Lipase untersucht (Abb. 21B und C). Die Serumaktivität von Amylase und Lipase ergab keinen Hinweis für eine akute Schädigung des Pankreasparenchyms. Zur Beurteilung der endokrinen Pankreas-

funktion wurde das Blut zusätzlich auf den Glukosegehalt untersucht (Abb. 21A). Auch diese Werte befanden sich im Normbereich und ergaben keinen Hinweis auf eine diabetogene Stoffwechsellaage.

W Wochen	RBC × (10 ¹² /L)	WBC × (10 ⁹ /L)	HB mmol/L	M Wochen	RBC × (10 ¹² /L)	WBC × (10 ⁹ /L)	HB mmol/L
8-12	9,2±0,2	7,1±0,5	9,1±0,2	8-12	9,2±0,5	3,6±0,5	8,3±0,5
16-20	9,2±0,2	5,4±0,4	9,0±0,2	16-20	8,8±0,2	7,4±0,7	8,5±0,2
24-28	8,0±0,6	5,5±1,0	8,0±0,6	24-28	8,3±0,2	7,8±0,5	8,2±0,1
32-40	7,7±0,4	3,6±0,4	7,6±0,3	32-40	8,7±0,3	8,7±0,3	8,9±0,5

Tabelle 6: Postoperative Vollblutanalyse weiblicher (W) und männlicher (M) Tiere. RBC = Erythrozyten, WBC = Leukozyten, HB = Hämoglobin.

Alter	Gewicht weiblicher Tiere in g	Gewicht männlicher Tiere in g
8-12 Wochen	30,6 ±0,7	40,2±0,7 [#]
16-20 Wochen	35,4±0,6	44,4±1,0 [*]
20-24 Wochen	41,3±1,1	47,6±1,4 ⁺
32-40 Wochen	38,9±1,0	51,1±1,0 ^{\$}

Tabelle 7: Gewicht der einzelnen Altersgruppen zum Operationszeitpunkt. Die Tiere aller männlichen Gruppen waren signifikant schwerer als die Tiere der entsprechenden weiblichen Gruppen. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; ANOVA, Holm Sidak; [#] $p < 0,001$ vs. weibliche Tiere 8-12 Wochen; ^{*} $p < 0,001$ vs. weibliche Tiere 16-20 Wochen; ⁺ $p < 0,001$ vs. weibliche Tiere 20-24 Wochen; ^{\$} $p < 0,001$ vs. weibliche Tiere 32-40 Wochen.

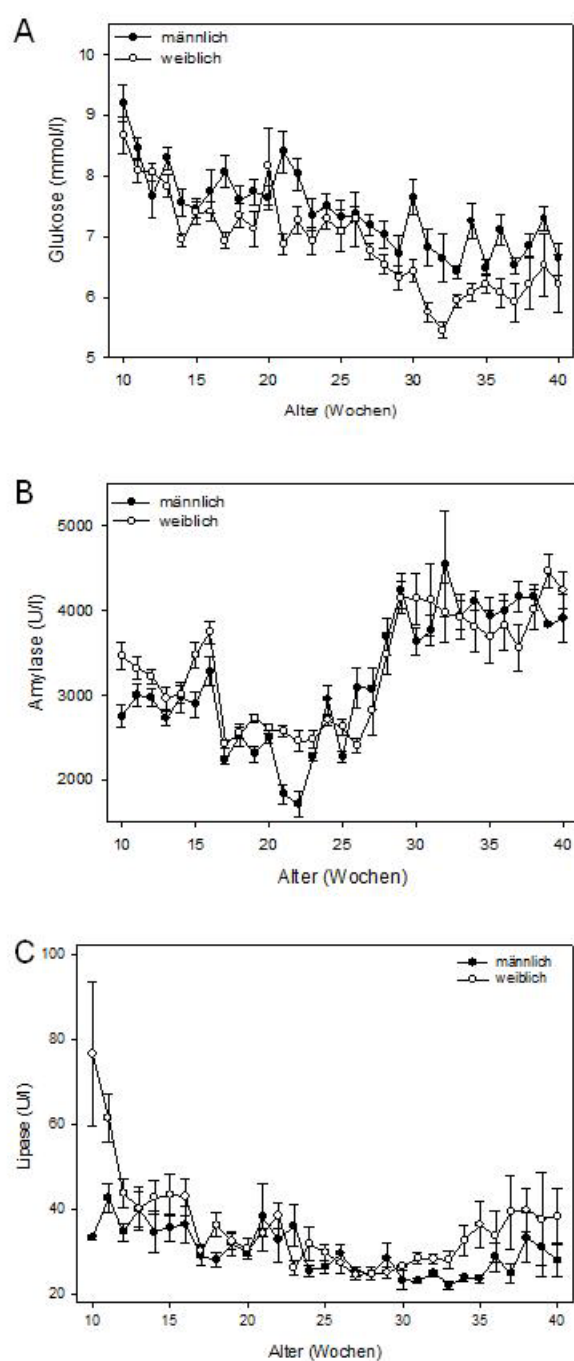


Abbildung 21: Um eine Schädigung des Pankreasparenchyms zu erfassen, erfolgte im Rahmen der repetitiven Blutentnahme die Bestimmung des Serumgehaltes von Glukose in mmol/l (A) sowie die Bestimmung der Aktivität der Enzyme Amylase (B) und Lipase (C) in U/l.

7 DISKUSSION

7.1 Tiermodelle der AIP

Zahlreiche experimentelle Untersuchungen wurden zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der AIP durchgeführt. Diese Analysen beschäftigen sich hierbei in Mehrheit mit feingeweblichen (Zamboni et al. 2004) und/oder serologischen (Kamisawa et al. 2005) Untersuchungen an Probenmaterial, welches von Patienten mit einer nachgewiesenen AIP gewonnen wurden. Da diese Untersuchungen dem komplexen, dynamischen Zusammenwirken der verschiedenen inflammatorischen Zellpopulationen in der AIP nicht gerecht werden können, sowie hämodynamische und mikrozirkulatorische Parameter außer Acht lassen, sind sie zum genaueren Verständnis der Pathogenese nicht ausreichend. Erst unter Zuhilfenahme von Tiermodellen konnten daher die Pathophysiologie zahlreicher Krankheitsbilder des Pankreas näher beleuchtet werden. Durch Tiermodelle können mannigfaltige Erkenntnisse über mikrozirkulatorische, genetische, histologische und serologische Aspekte von Krankheitsgeschehen gewonnen werden. Für zahlreiche Formen der Pankreatitis existieren daher gut etablierte Tiermodelle, welche einen großen Beitrag zum Verständnis des komplexen Ablaufs dieser Erkrankung liefern konnten. Grundsätzlich kann eine Pankreatitis im Tierexperiment auf verschiedene Weise induziert werden: *nicht invasiv* durch die Verabreichung von Wirkstoffen (pharmakologisch), *invasiv* durch direkte Manipulation am Pankreas, den ableitenden Gallenwegen und den versorgenden Gefäßen, *immunologisch* durch die Übertragung von Antikörpern oder spezifischen T-Zellen oder *genetisch* durch Züchtung oder durch gezielte Ein- oder Ausschaltung von Genen. Insbesondere für akute Pankreatitiden gibt es zahlreiche standardisierte und zuverlässig reproduzierbare Tiermodelle, die auf oben genannten Prinzipien beruhen. In nicht invasiven Modellen werden verschiedene Wirkstoffe zur Induktion einer akuten Pankreatitis (AP) verwendet. Pankreatische Stimulantien, wie Cerulein und Cholecystokinin, können zur Induktion einer akuten hämorrhagischen Pankreatitis verwendet werden (Büchler et al. 1992). Weiterhin kann eine AP durch i.p. Injektion von L-Arginin (Mizunuma et al. 1984) oder durch Fütterung von DL-Etionin in Cholin-defizienter Kost ausgelöst werden (Lombardi et al. 1975). In einer Vielzahl von Tiermodellen wird die AP durch ein invasives chirurgisches Vorgehen induziert. So kann eine experimentelle

Pankreatitis durch das Verschließen der duodenalen Schlinge kranial und kaudal der duodenalen Papille induziert werden. Dieses als „*Closed Duodenal Loop Technique*“ bekannte Modell wurde ursprünglich von Pfeffer und Mitarbeitern an Hunden etabliert und ist heute ein gut etabliertes und weit verbreitetes Modell zur Untersuchung der akuten hämorrhagischen Pankreatitis in verschiedenen Versuchstieren (Weber et al. 1992). Eine weitere Möglichkeit, eine akute hämorrhagische Pankreatitis zu induzieren, ist die retrograde Perfusion von Gallensäuren, wie Natrium-Taurocholat, in den pankreatischen Hauptgang (Aho et al. 1980). Die alleinige Ligatur des pankreatischen Hauptganges bewirkt hingegen keine akute Inflammation des Pankreas, wohl aber Atrophie und Apoptose der Azinuszellen und wird daher als Modell für Atrophie und Regeneration von Pankreasgewebe verwendet (Walker 1987).

Pankreatitismodelle, die durch Herabsetzung oder Unterbrechung der pankreatischen Perfusion mit anschließender Reperfusion induziert werden, sind gut etabliert. Durch diese Modelle können Störungen der pankreatischen Perfusion, wie sie beim hämorrhagischen Schock (Kyogoku et al. 1992) oder bei Pankreastransplantationen (Woeste et al. 2008), auftreten, abgebildet werden. Auch das der Ischämie folgende Reperfusionssyndrom ist Gegenstand tierexperimenteller Untersuchungen (Hoffmann et al. 1995).

Die akute alkoholtoxische Pankreatitis lässt sich tierexperimentell durch alleinige Verabreichung von Alkohol nur schlecht induzieren. Daher kombinieren viele Modelle die Verabreichung von Ethanol mit weiteren Maßnahmen, wie einer mechanischen Gangobstruktion oder der Verabreichung von Wirkstoffen, wie Cerulein oder Cholecystokinin (Foitzik et al. 1994).

Auch für die hereditäre Pankreatitis konnten Tiermodelle entwickelt werden. So konnte die Bedeutung einzelner Gene, welche für die Entwicklung einer erblichen Pankreatitis verantwortlich sind, erkannt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die transgene Expression von Ratten-SPINK 1 in Mäusen die Ausprägung einer Cerulein induzierten Pankreatitis signifikant mildert. Die transgenen Tiere zeigten eine deutlich verstärkte Kapazität zur Trypsin-Inhibition. Knockout-Mäuse, bei denen das dem humanen SPINK 1 entsprechende murine 3 ausgeschaltet war (-/-), zeigten eine erhöhte Trypsin-Aktivität und starben 2 Wochen nach der Geburt (Ohmuraya et al. 2006).

Auch für die chronische Pankreatitis (CP) existiert ein gut etabliertes Tiermodell. Nach Dibutylzinndichlorid (DBTC)-Exposition entwickeln Ratten eine Pankreatitis, welche durch fibrotischen Umbau und Atrophie des Organs charakterisiert ist. Durch dieses Modell konnten genauere Erkenntnisse zur Pathophysiologie dieses Krankheitsbildes erlangt werden (Glawe et al. 2005).

Wie bei anderen Formen der Pankreatitis sind auch bei der AIP Untersuchungen am intakten Organismus des Menschen aufgrund ihrer Invasivität nicht möglich. Daher ist die Etablierung von Tiermodellen, analog zu anderen Formen der Pankreatitis, zum genauen Verständnis der Pathophysiologie der AIP unumgänglich. In den letzten Jahren wurden daher zahlreiche Anstrengungen unternommen, ein Tiermodell der AIP zu entwickeln, welches gut reproduzierbar ist und dem Krankheitsbild der AIP möglichst exakt entspricht (Tab. 8).

Mäuse, die homozygot für die Mutation *aly* (alymphoplasia) sind, zeichnen sich durch das Fehlen von Peyerschen Plaques und Lymphknoten aus. Tsubata und Mitarbeiter konnten zeigen, dass diese Mäuse (*aly/aly*) chronische inflammatorische Veränderungen in exokrinen Organen, wie den Speicheldrüsen, Tränendrüsen und dem Pankreas, aufweisen. Daher wurden *aly/aly* Mäuse auch als Modell für das Sjögren-Syndrom vorgeschlagen, einer Krankheit, die eine häufige Co-Inzidenz mit der AIP aufweist (Tsubata et al. 1996).

Vallance und Mitarbeiter führten Untersuchungen an major histocompatibility complex (MHC) II defizienten Mäusen durch. Sie konnten zeigen, dass die Mäuse eine altersabhängige selektive Atrophie des exokrinen Pankreas aufwiesen, während das endokrine Pankreas intakt blieb. Zudem erkannten sie, dass durch den Transfer von mononuklearen Zellen MHC II defizienter Tiere auf Mäuse ohne Thymus diese Erkrankung übertragen werden kann (Vallance et al. 1998).

Davidson und Mitarbeiter schlugen ein Modell der AIP an Ratten vor. Sie konnten darlegen, dass der Transfer von Amylase spezifischen CD4⁺-T-Zellen auf gesunde sonst unbehandelte Ratten ausreichend ist, um eine Pankreatitis zu induzieren. Im Pankreas der erkrankten Tiere war die Entzündung im exokrinen Gewebe und den kleinen pankreatischen Gängen lokalisiert, während das endokrine Gewebe und die größeren Gänge nicht betroffen waren. Immunhistologisch fanden sich vorwiegend CD4⁺-T-Zellen im Entzündungsinfiltrat, seltener CD8⁺-T-Zellen und Makrophagen. Im Bereich der Läsionen war die Expression von MHC I und MHC II erhöht. Die

Schwere der Erkrankung war zudem abhängig von der Anzahl übertragener spezifischer CD4⁺-T-Zellen (Davidson et al. 2005).

Uchida et al. zeigten, dass Mäuse, welche kurz nach ihrer Geburt thymektomiert wurden, nach Immunisierung mit Carbo-Anhydrase und Lactoferrin eine Inflammation im Pankreas entwickeln. Carbo-Anhydrase ist physiologischerweise überwiegend im Gangepithel des Pankreas lokalisiert. Während die Übertragung von immunisierten CD4⁺-T-Zellen aus der Milz auf gesunde Mäuse ausreichte, um eine pankreatische Inflammation zu induzieren, konnte die Übertragung CD8⁺-Zellen keine Inflammation bewirken.

Ebenfalls als Modell einer AIP wurden CD28-defiziente-NOD-Mäuse vorgeschlagen. Diese CD28 knock-out Tiere entwickeln eine parenchymale und periduktale Inflammation, wobei das Entzündungsinfiltrat überwiegend aus CD4⁺-T-Zellen und B-Zellen besteht. In den erkrankten Tieren konnten autoreaktive T-Zellen und Amylase spezifische Autoantikörper nachgewiesen werden (Meagher et al. 2008).

Tiere des Inzucht-Stammes MRL/Mp entwickeln aufgrund ihrer genetischen Anlagen spontan verschiedene autoimmune Erkrankungen. Hierzu gehören der Lupus erythematoses, die rheumatoide Arthritis und Glomerulonephritiden (Hoffman et al. 1984). Da MRL/Mp-Mäuse, welche das Gen (*lpr/lpr*) ausprägen, diese Erkrankungen zu einem früheren Zeitpunkt, in größerer Inzidenz und stärkeren Intensität ausprägen, werden diese Tiere als Modelle für diese Erkrankungen bevorzugt herangezogen. Der Wild-Typ MRL/Mp^{*lpr*(-/-)} fand bis zur Beschreibung von Kanno und Mitarbeitern im Jahr 1992, dass MRL/Mp altersabhängig spontane Pankreatitiden mit autoimmuner Charakteristik entwickeln, jedoch nur wenig Beachtung. Weibliche Tiere sind hier häufiger von der Krankheit betroffen als männliche Tiere. Histologisch zeigen die erkrankten Tiere inflammatorische Läsionen im Pankreas, wobei untergegangenes Pankreasparenchym teilweise durch Fettgewebe ersetzt wird. Das endokrine Gewebe war auch bei schwer erkrankten Tieren weiterhin intakt. Immunhistologisch überwiegen im Entzündungsinfiltrat CD4⁺-T-Zellen und CD11b⁺-Makrophagen. Kanno et al. gelang es, durch adoptiven Transfer von aus der Milz gewonnenen T-Zellen die Krankheit auf gesunde Tiere zu übertragen. Die Übertragung von Serum von erkrankten auf nicht erkrankte Tiere war hingegen nicht ausreichend, um die Krankheit zu übertragen. Aufgrund des genetischen Hintergrundes der Tiere und der Übertragbarkeit der Erkrankung durch den Transfer

von T-Zellen äußerten Kanno und Mitarbeiter die These, dass die Erkrankung der Tiere eine autoimmune Genese haben könnte (Kanno et al. 1992). Weiter untermauert wurde dies durch Arbeiten von Hosaka, der zeigen konnte, dass eine Thymus-transplantation, aus neonatalen C57Bl/6-Mäusen in 7 Monate alte MRL/Mp Mäuse zur Rückbildung der pankreatischen Inflammation in MRL/Mp Mäusen führt, was darauf hindeutet, dass es sich bei der AIP um eine T-Zell-bedingte Erkrankung handelt (Hosaka et al. 1996).

Das AIP Modell der MRL/Mp Maus bietet somit verschiedene Vorteile im Vergleich zu anderen vorgeschlagenen Modellen: Im Gegensatz zu dem von Meagher und Vallance vorgeschlagenen Modellen bietet die MRL/Mp Maus die Möglichkeit, die AIP bei intaktem Immunsystem zu studieren. Auch muss die AIP nicht, wie bei Davidson und Uchida vorgeschlagen, experimentell induziert werden, sondern sie entwickelt sich spontan aufgrund einer polygenen Prädisposition. Einen Überblick über die verschiedenen Tiermodelle der AIP zeigt Tabelle 8.

Tierspezies	Induktion der AIP	Antigen	Effektorzellen	Referenz
Mäuse (<i>aly/aly</i>)	Genetisch, homozygot für (<i>aly</i>) Mutation	unbekannt	T-Zellen	Tsubata et al. (1996)
Mäuse (Kreuzung C57BL/6)	Genetisch, MHC II defizient	unbekannt	T-Zellen	Vallance et al. (1998)
Ratten (Lewis)	Immunologisch, Impfung mit spezifischen T-Lymphozyten	Amylase	CD4 und CD8 T-Zellen	Davidson et al. (2005)
Mäuse (nTx-BALB/c)	Immunologisch, Impfung mit spezifischen T-Lymphozyten	Lactoferrin und Carbo-Anhydrase	CD4 T-Zellen (TH1)	Uchida et al. (2003)
Mäuse (NOD.CD28KO)	Genetisch, gezielte Gen Ausschaltung	Amylase	CD4 T-Zellen	Meagher et al. (2008)
Mäuse (MRL/Mp)	Spontan aufgrund des genetischen Hintergrundes	unbekannt	CD4 und CD8 T-Zellen	Kanno et al (1992)

Tabelle 8: In der Vergangenheit wurden verschiedene Tiermodelle zur AIP vorgeschlagen, in welchen die Krankheit durch unterschiedliche Prinzipien induziert wird. Neben der Ausschaltung von Genen kann eine experimentelle AIP auch immunologisch durch einen Transfer von spezifischen T-Lymphozyten ausgelöst werden. MRL/Mp-Mäuse entwickeln aufgrund ihres genetischen Hintergrundes spontan verschiedene autoimmune Erkrankungen.

7.2 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODIK

7.2.1 MIKROZIRKULATIONSMODELLE

Mikrozirkulationsmodelle am lebenden Organismus erlauben die Untersuchung der Mikrohämodynamik sowie humoraler Kaskadensysteme bei intaktem systemischem Kreislauf und intaktem Nervensystem. Aufgrund ihrer Invasivität sind sie am Menschen nicht durchführbar, weshalb entsprechende Tiermodelle für die notwendigen Untersuchungen herangezogen werden. Am AIP-Modell der MRL/Mp-Maus konnten wir unter Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die gesamte Mikrozirkulation des physiologischen sowie pathologisch veränderten Pankreas visualisieren. Die Kinetik mikrohämodynamischer und inflammatorischer Parameter ist hierbei an terminalen Arteriolen, Kapillaren, postkapillaren Venolen des exokrinen und endokrinen Pankreas qualitativ zu erfassen und quantitativ zu charakterisieren.

In verschiedenen Tierspezies wurde über die letzten Jahrzehnte eine Vielzahl von Akutmodellen zur intravitalmikroskopischen Untersuchung von Organen und quantitativen Analysen ihrer Mikrozirkulation etabliert. Mittels Epi-Illumination und in vivo Fluoreszenzmikroskopie können die Mikrozirkulation von Gehirn (Villringer et al. 1989), Herz (Vollmar et al. 1995), Lunge (Kuhnle et al. 1993), Magen (Koo 1982), Darm (Bohlen & Gore 1976), Milz (McCuskey & McCuskey 1977), Niere (Steinhausen et al. 1981) und Skelettmuskel (Menger et al. 1992) quantitativ und qualitativ beurteilt werden. Auch verschiedenen Formen der Pankreatitis, wie die Pankreatitis nach Ischämie/Reperfusion (Menger et al. 1996), die Cerulein-induzierte-Pankreatitis (Liu et al. 1995b), die alkoholtoxische Pankreatitis (Foitzik et al. 1998b) sowie die DBTC-induzierte Pankreatitis (Glawe et al. 2005) wurden aufbauend auf den bekannten Tiermodellen hinsichtlich möglicher Mikrozirkulationsstörungen untersucht. Diese Studien konnten zeigen, dass Mikrozirkulationsstörungen zur Krankheitsentstehung, Aufrechterhaltung und Aggravierung der Pankreatitis beitragen. Studien zur Mikrozirkulation sind jedoch auch wichtiger Bestandteil in der Beschreibung autoimmuner Erkrankungen. Um die inflammatorischen Mechanismen autoimmuner Erkrankungen zu visualisieren, wurden für verschiedene autoimmune Erkrankungen, wie dem Typ-1-Diabetes (Cheung et al. 2009), der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (Dos Santos et

al. 2008) und der rheumatoiden Arthritis (Veihelmann et al. 1999), Mikrozirkulationsmodelle etabliert.

Untersuchungen zur Mikrozirkulation stellen somit einen wichtigen Bestandteil sowohl in der Untersuchung autoimmuner Erkrankungen als auch in der Untersuchung pankreatischer Inflammation dar. Bislang gibt es keine Erkenntnisse zu möglichen, den pathomorphologischen Veränderungen der AIP vorangehenden Störungen der Mikrozirkulation im Pankreas. Die vorliegende Studie ist somit die erste Untersuchung zu möglichen mikrozirkulatorischen Veränderungen im Rahmen der autoimmunen Erkrankung des Pankreas.

7.2.2 DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGSTECHNIKEN

7.2.2.1 Präparationstechnik und IVM

Die Intravitalmikroskopie (IVM) in Epi-Illumination diente in dieser Studie als Hauptuntersuchungstechnik. Die Technik erlaubt die Analyse individueller Segmente der Mikrozirkulation, d.h. der Arteriolen, Kapillaren und Venolen sowie die detaillierte Beobachtung und Quantifizierung dynamischer Phänomene über einen längeren Zeitraum. Die Intravitalmikroskopie ist als sogenannte „direkte Technik“ anderen Untersuchungsmethoden wie z.B. der Mikrosphären-Technik (Vollmar et al. 1992), der H₂-Clearance-Technik (Young 1980; Gouma et al. 1986) oder der Laser-Doppler-Flowmetrie (Micheels et al. 1984), welche allesamt nur indirekte Aussagen über die Mikrozirkulation des Pankreas zulassen, deutlich überlegen.

Die chirurgische Präparation des Pankreas zur intravitalmikroskopischen Untersuchung macht eine Narkotisierung der Tiere zwingend notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Kombination der Wirkstoffe Ketamin und Xylazin für eine sichere Analgosedierung von Mäusen bei ausreichend stabilen Herz-/Kreislaufverhältnissen eignet (Buitrago et al. 2008). Die durch Ketamin bewirkte "dissoziative Anästhesie" entspricht einem Bewusstseinszustand, bei dem Teile des ZNS gehemmt und andere erregt sind. Einerseits sind Schmerzempfindung (Analgese) und Bewusstsein (Anästhesie) ausgeschaltet, andererseits bildet sich eine motorische Starre (Katalepsie) aus. Die atemdepressive Wirkung ist gering, das Blutdruck und Herzzeitvolumen sind leichtgradig erhöht und die Hirnstammreflexe bleiben erhalten (Reich & Silvay 1989). Aufgrund seiner kreislaufstabilisierenden

Effekte ist Ketamin das Mittel der Wahl zur Analgosedierung in der Notfallmedizin (Paal et al. 2010). Erst die Injektion hoher Dosen des Wirkstoffs kann zu unerwünschten Wirkungen, wie Atemdepression, Hypoxämie, Hyperkapnie, Apnoe und Bronchodilatation führen (Carroll & Hartsfield 1996; Plumb 1999). Xylazin ist ein potenter α_2 -Agonist, der neben einem sedativ-hypnotischen Zustand auch muskelrelaxierend wirkt. Die Wirkung von Xylazin wird durch Aufregung und Nervosität beeinträchtigt. Daher sollten die Tiere bis zum vollen Wirkungseintritt nicht durch Berührung oder Lärm beeinflusst werden. In zu hoher Dosierung kann Xylazin zu verschiedenen unerwünschten Nebenwirkungen, wie Herzrhythmusstörungen oder zu einer prolongierten Hypotonie führen (England & Clarke 1996). Die für die Präparation des Pankreas notwendige Laparotomie und die Auslagerung des Pankreas verursachen ein chirurgisches Trauma, welches Einfluss auf die Mikrozirkulation nimmt (Sorg et al. 2009). Um das chirurgische Trauma möglichst gering zu halten, wurde das Pankreas intraoperativ möglichst nicht berührt und regelmäßig befeuchtet. Der genaue Einfluss der Narkose und des chirurgischen Traumas auf die Mikrozirkulation des Pankreas kann letztlich aber nicht abschließend beurteilt werden, da entsprechende Vergleichsmessungen am wachen, nicht laparotomierten Tier unmöglich sind. Die *ex vivo* durchgeführten histopathologischen Untersuchungen des Gewebes lassen jedoch auf physiologische Bedingungen während der intravitalen Untersuchungen schließen.

Nach Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen erlaubt die intravitale Mikroskopie unter Verwendung verschiedener Filterblöcke die Visualisierung des Pankreas mit gleichzeitiger Analyse sowohl mikrozirkulatorischer als auch zellulärer Aspekte. Da die Epi-Illuminationstechnik die Begutachtung größerer Areale des Pankreas erlaubt, können pathophysiologische Veränderungen, wie z.B. ein Versagen der nutritiven Perfusion, direkt visualisiert werden. Des Weiteren können Leukozyten durch Anfärbung mit Rhodmamin 6G visualisiert werden und so mögliche Leukozytenakkumulationen als Zeichen einer Inflammation nachgewiesen werden (Plusczyk et al. 2001).

Die IVM ermöglicht die Darstellung einer solchen Inflammation bereits zu frühen Zeitpunkten, in denen noch kein direkter histologischer Gewebeschaden erkennbar ist. Daher ist diese Technik besonders zur Charakterisierung früher Entzündungsstadien geeignet (Gierer et al. 2005).

Die IVM in Epi-Illuminationstechnik ermöglicht also die Visualisierung von pankreatischer Inflammation und Mikrozirkulation. Sie stellt daher die ideale Untersuchungstechnik zur *in vivo* Analyse der Pathogenese der AIP dar.

7.2.2.2 Weitere Untersuchungstechniken

Die repetitive Blutentnahme wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob das Einsetzen der Krankheit mit möglichen laborchemischen Veränderungen sowie einer Änderung des Allgemeinzustandes der Tiere einhergeht. Als indirekte Parameter zur Bestimmung eines akuten Gewebeschadens im Pankreas wurde daher die Aktivität der Enzyme Amylase und Lipase im Serum untersucht, da für diese Enzyme bekannt ist, dass sie in der akuten Phase einer Pankreatitis ansteigen (Sparmann et al. 1997). Die Untersuchung dient somit als Parameter einer akuten Parenchymschädigung. Weiterhin wurden die Tiere auf das Vorliegen einer diabetogenen Stoffwechsellage untersucht, was auch die Folge einer autoimmunen Reaktion gegen die das Insulin produzierenden β -Zellen des endokrinen Pankreas sein kann (Eisenbarth 1986).

Um die intravital gewonnenen Untersuchungsergebnisse zu verifizieren, wurden die Pankreata der Tiere *ex vivo* histologisch, immunhistologisch und molekularbiologisch untersucht. Die histologische Untersuchung erfolgte anhand eines pathologischen Scores (Kanno et al. 1992). Um das Entzündungsinfiltrat in den Pankreata der Tiere genauer zu charakterisieren, wurden Gewebeschnitte der ältesten Gruppe (32-40 Wochen) immunhistologisch untersucht. Dies erfolgte unter Verwendung von Antikörpern, welche gegen typische Oberflächenproteine der jeweiligen Zellpopulationen gerichtet waren, wie für Plasmazellen CD138 (Rawstron 2006), für T-Helferzellen CD4, für T-Effektorzellen CD8, und für Makrophagen CD11b. Weiterhin wurde die Aktivität einzelner Gene, die in entzündetem Gewebe typischerweise hochreguliert sind, molekularbiologisch bestimmt. Durch die Kombination der von uns *in vivo* und *ex vivo* durchgeführten Untersuchungen konnten wir eine umfassende Charakterisierung der inflammatorischen Aktivität im Pankreas der MRL/Mp-Maus, sowohl über die Zeit als auch geschlechterspezifisch, vornehmen.

7.3. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Für die Pankreatitis der MRL/Mp-Maus wurde aufgrund der genetischen Prädisposition der Tiere, des spontanen Auftretens der Erkrankung, des histopathomorphologischen Befundes und der Übertragbarkeit der Erkrankung durch T-Zell-Transfer eine autoimmune Genese postuliert.

In der vorliegenden Studie konnte nun zum ersten Mal durch *in vivo* Untersuchungen belegt werden, dass die Pankreatitis der MRL/Mp Maus durch eine vorangehende intrapankreatische Inflammation getriggert wird.

In den von uns intravitalmikroskopisch untersuchten Tieren konnten wir einen altersabhängig signifikanten Anstieg der Zahl adhärenter Leukozyten nachweisen. Diese von uns *in vivo* nachgewiesene Leukozytenakkumulation in den postkapillaren Venolen des Pankreas bildet das Korrelat der Infiltration von Leukozyten ins Pankreasparenchym. Die Infiltration von Leukozyten ins Gewebe ist physiologischer Bestandteil der Leukozyten-Zirkulation zwischen Blut, sekundären Lymphorganen und Gewebe und dient dem Schutz der Integrität des Organismus. Kommt es durch Infektion, Trauma oder Hypoxie zur Schädigung von Gewebe, wird eine immunologische Reaktion in Gang gesetzt, in deren Rahmen vermehrt Leukozyten das entzündete Gewebe infiltrieren. Die Infiltration von Leukozyten ins Gewebe stellt den integralen Schritt der Initiation einer Immunreaktion dar und wird auch als transendotheliale Migration (TEM) bezeichnet. Diese unterliegt einer stringenten Kontrolle, denn unkontrollierte TEM oder TEM an inadäquater Stelle führt zu verstärkter Inflammation und Parenchymschädigung von an sich intaktem Gewebe, wie sie sich bei Autoimmunerkrankungen häufig findet (Wittchen 2009).

Bevor zirkulierende Leukozyten das Gewebe infiltrieren können, müssen sie sich in einem mehrstufigen Prozess dem Endothel annähern (Margination), an ihm entlangrollen, adhärieren und durch die endotheliale Barriere emigrieren (Butcher 1991). Für verschiedene autoimmune Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass die Infiltration von Leukozyten ins Gewebe eine notwendige Voraussetzung für die Krankheitsentstehung ist, da eine Blockade der für die Infiltration notwendigen Adhäsionsmoleküle suffizient ist, den Krankheitsausbruch zu verhindern oder abzuschwächen. Beim autoimmunen Diabetes mellitus kommt es zu einer Reaktion

gegen die das Insulin produzierenden β -Zellen des endokrinen Pankreas. Als Modell dieser Erkrankung dienen NOD-Mäuse, welche einen spontanen Typ-1-Diabetes ausbilden. Es konnte gezeigt werden, dass die Krankheit analog zur AIP der MRL/Mp-Maus durch den Transfer von aus der Milz gewonnenen T-Lymphozyten übertragbar ist. Durch Blockade der für die TEM notwendigen Adhäsine VCAM-1, L-Selectin und α -4-Integrin konnte die Übertragung der Erkrankung verhindert werden (Yang et al. 1993). Die Blockade von β 2-Integrin und ICAM-1 hingegen war nicht ausreichend, um die Übertragung der Erkrankung zu verhindern (Baron et al. 1994). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass NOD-Mäuse, die nach Übertragung eines viralen Vektors ein löslichen ICAM-1 (sICAM-1-Ig) ausbilden, in eine Remission ihrer Erkrankung kommen, so dass ICAM-1 als möglicher therapeutischer Angriffspunkt postuliert wurde (Bertry-Coussot et al. 2002).

MRL/*fas*^{lpr}-Mäuse erkranken an einem dem Lupus erythematoses ähnlichen Syndrom und werden daher als Modell dieser autoimmunen Erkrankung eingesetzt. Eine intravitalmikroskopische Untersuchung der Mikrozirkulation der Haut ergab, dass die Zahl adhärenter Leukozyten in der Haut von ICAM-1 defizienten Mäusen signifikant niedriger ist als in herkömmlichen MRL/*fas*^{lpr}-Mäusen (Norman et al. 2008). Die Bedeutung der durch Adhäsionsmoleküle vermittelten Infiltration von Leukozyten ins Gewebe für den Krankheitsverlauf ergibt sich aus der Tatsache, dass ICAM-1 defiziente MRL/*fas*^{lpr}-Mäuse signifikant länger als MRL/*fas*^{lpr}-Mäuse leben (Lloyd et al. 1997).

Leukozyten-Akkumulationen finden sich jedoch auch in Pankreatitiden anderer Genese, wie z.B. der Cerulein-induzierten Pankreatitis (Hackert et al. 2004), der DBTC-induzierten Pankreatitis (Glawe et al. 2005) und der Alkohol-induzierten Pankreatitis (Foitzik et al. 1998b). Im Gegensatz zu diesen experimentellen Pankreatitiden geht der Pankreatitis der MRL/Mp-Maus jedoch kein iatrogener Stimulus voraus, der die Inflammation bedingen könnte. Vielmehr weisen bereits die von uns untersuchten jungen Tiere eine erhebliche Leukozyten-Akkumulation in den postkapillaren Venolen des Pankreas auf, obwohl die Pankreata der Tiere bei der *ex vivo* durchgeführten histopathologischen Untersuchung unauffällig waren. Erst in älteren Tieren konnten dann auch histologisch nachweisbare Veränderungen im Pankreasparenchym gefunden werden. Wird der von uns erfasste durchschnittliche histopathologische Score in Beziehung zur durchschnittlichen Zahl adhärenter Leukozyten der jeweiligen Gruppe gesetzt, so ergibt sich eine signifikant positive

Korrelation. Der intravitalmikroskopisch nachweisbaren Zunahme der intrapankreatischen Leukozyten-Akkumulation folgt zeitverzögert ein exponentieller Anstieg der histopathologisch nachweisbaren Gewebeschädigung (Abb. 22).

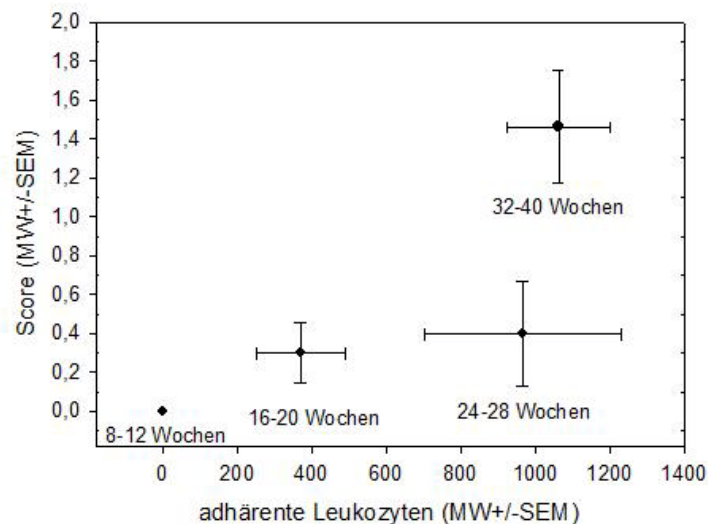


Abbildung 22: Korrelationsanalyse zwischen dem durchschnittlichen histopathologischen Score und der durchschnittlichen Zahl adhärenter Leukozyten in den vier Altersgruppen weiblicher Tiere. Es besteht eine signifikant positive Korrelation zwischen Leukozyten-Adhärenz *in vivo* und histopathologischem Score. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Die Tatsache, dass die von uns erfasste Inflammation der pathomorphologischen Gewebeschädigung vorausgeht, ist typisch für Erkrankungen autoimmuner Genese. Hier ist die Ursache der Inflammation eine immunologische Reaktion, welche durch eine inadäquate Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten, Gewebeschädigung und -dysfunktion verursacht wird (Norman & Hickey 2005). Auch bei anderen autoimmunen Erkrankungen konnten solche frühen Veränderungen im Immunsystem gefunden werden. So ist bei der rheumatoiden Arthritis (RA) die Hochregulierung des Immunsystems ein essentieller Teil der Pathogenese. Eine Charakterisierung der Mikrozirkulation in den synovialen Venen von Mäusen, welche nach Impfung mit Kollagen II eine experimentelle RA entwickeln, ergab, dass es schon vor Einsetzen der klinischen Symptome zu einer vermehrten Leukozyten-Akkumulation in den synovialen Venen der Kniegelenke kommt. Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ist bei der RA also nicht nur ein Teil der Ausbreitung und Aufrechterhaltung des

Krankheitsgeschehens, sondern auch Teil seiner Initiation (Gierer et al. 2005). Auch in IL-4-Tg-Mäusen, welche eine spontane atopische Dermatitis ausbilden, konnte gezeigt werden, dass es bereits im frühen Krankheitsstadium zu einer kontinuierlichen Infiltration von T-Zellen aus den sekundären lymphoiden Organen in die Haut der Tiere kommt (Chen et al. 2005).

Neben der *in vivo* erfassten Leukozyten-Akkumulation bildet die Abnahme der Kapillardichte und der Blutzellfließgeschwindigkeit in Abhängigkeit des pathologischen Scores ein weiteres Korrelat der Inflammation im Pankreas der MRL/Mp Maus. Störungen der pankreatischen Mikrozirkulation sind schon seit vielen Jahren Gegenstand wissenschaftlicher Arbeiten. Anderson und Mitarbeiter etablierten in den 1960er Jahren Mikrozirkulationsmodelle akuter Pankreatitiden (Anderson & Schiller 1968; Anderson et al. 1967). Warshaw und Mitarbeitern gelang es dann, die hohe Vulnerabilität des Pankreas gegenüber systemischen Zirkulationsstörungen aufzuzeigen. Durch Autopsien an Patienten, welche vor ihrem Tod einen hypovolämischen Schock erlitten hatten, konnte gezeigt werden, dass eine systemische Perfusionsstörung ausreichend ist, um eine Pankreatitis auszulösen (Warshaw & O'Hara 1978). Aus dieser Erkenntnis folgte die Frage, welche Rolle Mikrozirkulationsstörungen in der Pathogenese der AP spielen. Daher wurden verschiedene Untersuchungen zur Rolle der pankreatischen Mikrozirkulation in der Pathogenese der AP durchgeführt (Kerner et al. 1996; Vollmar et al. 1991; Schiller et al. 1975). Es wurde erkannt, dass Störungen der pankreatischen Mikrozirkulation nicht nur als Folge der pankreatischen Inflammation auftreten, sondern diese auch aggravieren und induzieren können und somit zentraler Bestandteil der Pathogenese sind (Zhang et al. 2009; Foitzik et al. 2002; Menger et al. 2001). Auch in Modellen chronischer Pankreatitiden, wie der alkoholtoxischen Pankreatitis (Witt et al. 2007) und der DBTC-induzierten chronischen Pankreatitis (Glawe et al. 2005), konnten Mikrozirkulationsstörungen nachgewiesen werden. Die vorliegende Studie belegt erstmals, dass es auch in der AIP zu Mikrozirkulationsstörungen kommt (Sorg et al. 2008).

Die wichtigsten Störungen der Mikrozirkulation in der Pankreatitis betreffen das Versagen der nutritiven kapillaren Perfusion sowie die Abnahme der kapillaren Blutzellfließgeschwindigkeit, wobei die Abnahme der Zahl perfundierter Kapillaren mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Klar et al. 1990; Bassi et al. 1994). Folge der

Mikrozirkulationsstörung ist eine Ischämie im Gewebe des Pankreas, welche ihrerseits ein pathogenetischer Faktor für die Aufrechterhaltung und Potenzierung des entzündlichen Geschehens ist (Broe et al. 1982).

Verschiedene pathogenetische Mechanismen, welche in Modellen akuter Pankreatitiden untersucht wurden, vermitteln dieses Pankreatitis-assoziierte Versagen der nutritiven Perfusion in der AP. Eine zentrale Stellung nimmt die entzündungsbedingte Verschiebung des Gleichgewichts zwischen gefäßkontrahierenden und gefäßdilatierenden Mechanismen zugunsten der Vasokonstriktion ein. Die Konzentration von Stickstoffmonoxid (NO) als wichtigster vasodilatierender Metabolit ist im entzündeten Gewebe des Pankreas vermindert (Shibuya et al. 1996), gleichzeitig kann durch Verabreichung von NO-Donatoren das Perfusionsversagen in der experimentellen Pankreatitis reduziert werden (Liu et al. 1995a). Endothelin-1 kann als kompetenter Vasokonstriktor die Mikrozirkulationsstörung der experimentellen Pankreatitis aggravieren (Plusczyk et al. 1999), während die Blockade des Endothelin-1 Rezeptors eine gegenteilige Wirkung hat (Foitzik et al. 1998a). Weiterhin konnte durch Blockade verschiedener biologisch aktiver Peptide, welche als Vasokonstriktoren wirken, wie Bradykinin, Trypsin und Kallikrein, eine Verbesserung der Mikrozirkulation im entzündeten Pankreas erreicht werden (Bloechle et al. 1998; Chen et al. 1996). Ein weiteres kritisches Element für die Mikrozirkulation im entzündeten Pankreas stellt die Familie der Interleukine dar (Menger et al. 2001). Im Pankreas der MRL/Mp-Maus konnten wir eine Hochregulierung der Gene von IL-1 β , IL-2 und IL-6 nachweisen. IL-1 kommt hier eine Schlüsselrolle in der AP zu. Die Konzentrationen von IL-1 korrelierten mit der Schwere der humanen AP (Hirota et al. 2000). Experimentell konnte durch den Einsatz von IL-1-Inhibitoren die Überlebensrate in der experimentellen AP erhöht werden (Norman et al. 1997). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Heparin Störungen der Mikrozirkulation in der experimentellen Pankreatitis abmildert und gleichzeitig zu einem deutlichen Abfall des IL-1-Serumspiegels führt (Ceranowicz et al. 2008). Auch für IL-6 konnte nachgewiesen werden, dass es ein kritischer Faktor für die kapillare Perfusion darstellt (von Dobschuetz et al. 1999). Die von uns beobachtete Leukozyten-Akkumulation in den postkapillaren Venolen nimmt in der AP in verschiedener Weise Einfluss auf mikrozirkulatorische Parameter. Durch die Gabe von ICAM-1 spezifischen Antikörpern werden die Mikrozirkulationsstörungen in der Cerulein-induzierten Pankreatitis abgeschwächt und die Erkrankung ist

deutlich geringer ausgeprägt (Foitzik et al. 2000). Nach Infusion von pankreatischen Proteasen konnte in einem Modell der Pathogenese der AP Leukozyten-Akkumulationen, welche mit einer Abnahme der kapillaren Blutzellfließgeschwindigkeit verbunden war, nachgewiesen werden (Keck et al. 2005). Die ICAM-vermittelte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie die exzessive Produktion inflammatorischer Mediatoren stellt einen Verbindungspunkt zwischen der AIP und anderen Formen der Pankreatitis dar.

Somit könnte die Ursache des von uns in der MRL/Mp-Maus histologisch nachgewiesenen Gewebeschadens also auch auf die von uns nachgewiesenen Störungen der Mikrozirkulation zurückzuführen sein. Aufgrund der chronischen Inflammation im Pankreasparenchym kommt es zu einer inflammatorisch vermittelten Störung der nutritiven Perfusion, welche den durch die autoimmune Reaktion verursachten Gewebeschaden potenzieren könnte (Abb. 23).

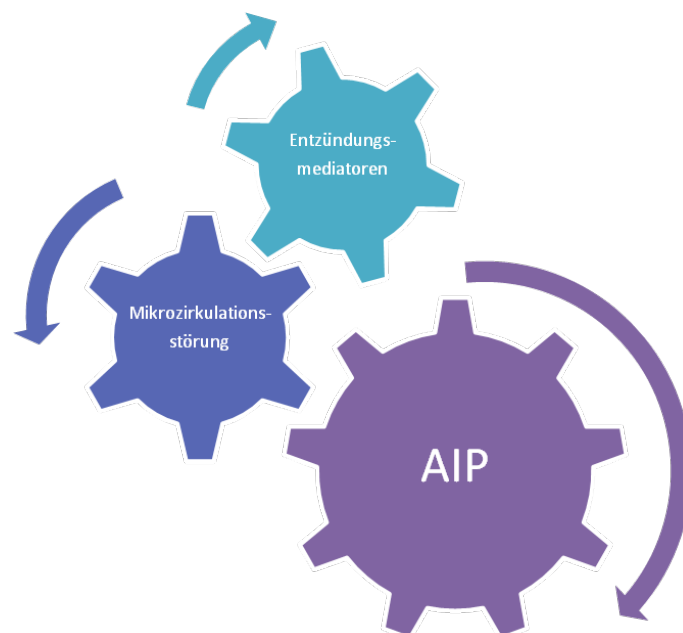


Abbildung 23: Die durch das Immunsystem in Gang gesetzte Entzündungsreaktion im Pankreasparenchym führt zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren mit konsekutiver Leukozytenakkumulation in den postkapillaren Venolen des Pankreas. Wie auch bei anderen Formen der Pankreatitis kommt es durch diese Entzündungsmechanismen zu einer schwerwiegenden Störung der pankreatischen Mikrozirkulation. Folge dieser Störung ist das Versagen der nutritiven Perfusion. Die hierdurch entstehende Hypoxie im Pankreasparenchym könnte den durch die autoimmune Reaktion bedingten Gewebeschaden potenzieren und die Inflammation aggravieren.

Die *in vivo* dargestellte Leukozyten-Akkumulation in den postkapillaren Venolen des Pankreas wurde durch die lichtmikroskopische Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte bestätigt. In erkrankten Tieren fanden sich exzessive Leukozyten-Akkumulationen, insbesondere in der Nähe der kleinen Gefäße. Die Charakterisierung des pankreatischen Entzündungsinfiltrates in weiblichen und männlichen Tieren der ältesten Gruppe ergab signifikant erhöhte Werte für CD138⁺-Plasmazellen, CD11b⁺-Makrophagen sowie CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten in weiblichen Tieren gegenüber männlichen Tieren.

Die CD4⁺-T-Helfer-Zellen moderieren sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunabwehr. Aufgabe der T-Helfer-Zellen ist es, nach Kontakt mit einer antigenpräsentierenden Zelle durch die Ausschüttung von Zytokinen die Aktivierung, Proliferation und Reifung von Makrophagen, T-Zellen, Effektor-Zellen und B-Lymphozyten voranzutreiben und so eine immunologische Reaktion in Gang zu setzen. In verschiedenen autoimmunen Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, der rheumatoiden Arthritis und dem Diabetes mellitus Typ I spielen T-Lymphozyten und insbesondere die CD4⁺ Subpopulation eine Schlüsselrolle (Norman & Hickey 2005). T-Helferzellen können anhand der von ihnen produzierten Zytokine weiter in T-Helfer 1 (TH1)-Zellen und T-Helfer 2 (TH2)-Zellen unterteilt werden. Während TH1-Zellen IL-2, TNF- α und INF- γ herstellen, produzieren TH2-Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Obwohl immunologische Reaktionen nicht isoliert TH1 oder TH2 gesteuert sind, sind Dysbalancen im Verhältnis zwischen TH1/TH2 Zellen eine häufige Beobachtung im Krankheitsverlauf autoimmuner Erkrankungen (Shi & Walker 2002). Bei atopischen Erkrankungen, wie z.B. dem allergischen Asthma, finden sich überwiegend von TH2-Zellen sezernierte Zytokine. Diese Erkrankungen gelten daher als TH2-vermittelte Erkrankungen (Lloyd & Hawrylowicz 2008). Die experimentelle Enzephalomyelitis, die als Modell der Multiplen Sklerose dient, gilt hingegen als überwiegend TH1 gesteuert. Okazaki schlug vor, dass es bei der AIP analog zum Sjögren-Syndrom initial zu einer TH1-vermittelten Immunreaktion kommt, die dann im Krankheitsverlauf von einer überwiegend TH2-vermittelten Reaktion abgelöst würde (Okazaki & Chiba 2002). Tatsächlich konnte Zen und Kollegen bei AIP-Patienten ein Zytokin-Profil nachweisen, welches einer TH2-Reaktion entspricht (Zen et al. 2007).

Eine weitere CD4⁺-T-Zellpopulation, die eine Rolle in der Pathogenese der AIP spielen könnte, sind die CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs; früher

T-Suppressor-Zellen). Tregs spielen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz, indem sie die Proliferation und Aktivierung von T-Effektor-Zellen aktiv supprimieren können. Diese insbesondere durch die Produktion von IL-10 und TGF- β vermittelte anti-inflammatorische Kompetenz soll vor dem Entstehen autoimmuner Erkrankungen schützen (Bacchetta et al. 2007). Außerdem sind Tregs in der Lage, auf die Aktivität von TH1- und TH2-Zellen Einfluss zu nehmen (Bonelli et al. 2008). Für verschiedene autoimmune Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der Erkrankung zu quantitativen (Kuhn et al. 2009) und qualitativen (Yan et al. 2008) Störungen in Homöostase und Funktion der Tregs kommt. Bei Patienten, die an einer AIP und anderen sklerosierenden Erkrankungen litten, konnten erniedrigte Werte für naive Tregs und erhöhte Werte für reife Tregs nachgewiesen werden (Zen et al. 2007; Miyoshi et al. 2008), so dass eine Störung der Homöostase der Tregs auch in der Pathogenese der AIP möglicherweise eine Rolle spielen könnten. Neben den TH1, TH2 und Tregs wurde im Jahr 2005 mit den TH17 Zellen eine weitere CD4⁺-T-Helfer Zellpopulation beschrieben (Harrington et al. 2005). Nach Stimulation durch IL-23 produzieren die TH17-Zellen IL-17 und tragen so zur chronischen Gewebeinflammation bei (Paradowska-Gorycka et al. 2010). Dieser IL-23/IL17-Achse wird in der Pathogenese verschiedener autoimmuner Erkrankungen, wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Maloy 2008), der rheumatoiden Arthritis (Gaffen 2009) und der Multiplen Sklerose, eine zentrale Rolle zugeschrieben (Tesmer et al. 2008). Auch in der AIP ist eine Vielzahl verschiedener Interleukine erhöht (Löhr et al. 2010), so dass die IL-23/IL17-Achse auch in der AIP eine Rolle spielen könnte.

Ein weiteres zentrales Merkmal der AIP ist der Nachweis von erhöhten Werten von Serum IgG4 (Choi et al. 2007) sowie von IgG4-produzierenden-Plasmazellen im Pankreas (Kamasiwa et al. 2007). Aufgrund der Tatsache, dass es in Mäusen keinen zum humanen IgG4 analogen Antikörper gibt, ist eine genaue Zuordnung nicht möglich (Aalberse et al. 2009). Die von uns im Entzündungsinfiltrat nachgewiesenen CD138⁺-Plasmazellen könnten das Korrelat zu den in der humanen AIP häufig nachgewiesenen IgG4-produzierenden-Plasmazellen bilden. Obwohl IgG4 in der Diagnostik der humanen AIP eine zentrale Rolle spielt, ist seine Bedeutung in der Pathogenese unklar. IgG4 stellt die seltenste Immunglobulin Substanzklasse von IgG dar und wird häufig gemeinsam mit IgE im Serum von Allergikern nachgewiesen. Die Ursache hierfür ist, dass sowohl IgG4 als auch IgE als Teil der durch TH2-Zellen

vermittelten Immunantwort gelten (Punnonen et al. 1993). Obwohl die Funktion von IgG4 unklar ist, legen verschiedene Arbeiten nahe, dass die Rolle von IgG4 eher anti-inflammatorischer Natur ist. So konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von IgG4 durch das anti-inflammatorische IL-10 gesteuert wird (Satoguina et al. 2005). Weiterhin können Antikörper der Klasse IgG4 bei Allergikern häufig erst nach längerer Antigen-Exposition nachgewiesen werden und gehen dann mit einem Nachlassen der Symptome einher. Daher werden steigende Werte von IgG4 und des IgG4/IgG Quotienten als Zeichen einer erfolgreichen Immuntherapie gewertet (Aalberse & Schuurman 2002). Insgesamt scheint die Anwesenheit von IgG4 darauf hinzudeuten, dass anti-inflammatorische, toleranzinduzierende Mechanismen aktiviert wurden. Daher wurde die Hypothese geäußert, dass IgG4⁺-Plasmazellen bei der AIP einen zweiten Schritt des immunologisch vermittelten inflammatorischen Prozesses sein könnten und den Versuch des Körpers darstellen, eine überschießende Immunreaktion zu dämpfen (Deshpande et al. 2006).

Weiterhin konnten wir in der vorliegenden Studie zeigen, dass die MRL/Mp-Mäuse altersabhängig ANAs bilden. ANAs werden bei verschiedenen systemischen autoimmunen Erkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematoses oder der rheumatoiden Arthritis häufig beobachtet. Aber auch im Serum von AIP-Patienten konnten ANAs nachgewiesen werden (Okazaki et al. 2008).

Die Erkenntnisse der vorliegenden Studie untermauern also die zuvor postulierte Vermutung, dass es sich bei der Pankreatitis der MRL/Mp-Maus um eine Erkrankung autoimmuner Genese handelt und dass sich die MRL/mp Maus als Modell der AIP eignet.

7.4 HYPOTHESEN ZUR PATHOGENESE DER AIP

Die genaue Pathogenese der AIP ist nach wie vor unklar und insbesondere das der Autoimmunität zugrundeliegende Antigen ist nicht bekannt (Park et al. 2009; Sorg et al. 2008). Nichtsdestotrotz wurden verschiedene Hypothesen zur Pathogenese (Okazaki et al. 2002; Jaster & Emmerich 2006; Park et al. 2009) und zu möglichen Antigenen (Löhr et al. 2010; Frulloni et al. 2009) der AIP postuliert, welche auf den verschiedenen serologischen und histologischen Beobachtungen von AIP-Patienten sowie auf Erkenntnissen aus Tiermodellen der AIP beruhen.

Verschiedene Beobachtungen deuten darauf hin, dass das der AIP zugrundeliegende Antigen im Gangepithel des Pankreas lokalisiert sein könnte (Jaster & Emmerich 2006). So ist das entzündliche Infiltrat überwiegend periduktal konzentriert (Klöppel et al. 2005b). Des Weiteren sind die am häufigsten bei AIP-Patienten beobachteten Antikörper gegen Lactoferrin und die Carboanhydrase II gerichtet, wobei die humane Carboanhydrase II das Leitenzym der Pankreasgangzellen bildet (Schneider & Löhr 2009). Diese Beobachtung deckt sich mit der Hypothese, dass molekulares Mimikry in der Entstehung der AIP eine Rolle spielen könnte. Kountouras et al. schlugen vor, dass es durch eine Kreuzreaktion zwischen eigentlich gegen ein Bakterium gerichtete Antikörper und dem Pankreasgangepithel zur Krankheitsentstehung kommen könnte (Kountouras et al. 2005). Diese These konnte durch die Arbeit von Guarneri und Kollegen untermauert werden, die eine signifikante Homologie zwischen der α -Carboanhydrase von *Helicobacter pylori* und der humanen Carboanhydrase II fanden (Guarneri et al. 2005).

Gleichzeitig wurden in den letzten Jahren -bedingt durch eine intensivierete Suche- jedoch auch Antikörper gegen weitere potentielle Autoantigene gefunden, die nicht im Gangepithel lokalisiert sind. Löhr et al. konnten Antikörper gegen die Trypsinogene PRSS1, PRSS2 und Asada et al. gegen das Trypsin Inhibitor Enzym, dem Produkt des SPINK1-Genes, nachweisen (Löhr et al. 2010; Asada et al. 2006). Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass die nachgewiesenen Antikörper gegen zelluläre Strukturen des Pankreas nicht unbedingt die Ursache der primären Inflammation sein müssen. Denkbar ist auch, dass erst im Rahmen der autoimmunen Reaktion weitere antigene Strukturen demaskiert werden und es dann zur Ausbildung von Autoantikörpern gegen diese „sekundären“ Antigene kommt.

Aufgrund der regionalen Häufung der AIP insbesondere in Asien wurden Anstrengungen unternommen, eine mögliche genetische Komponente in der Pathogenese aufzudecken. Kawa et al. berichteten, dass der Haplotyp DRB10405-DQB10401 des Humanen Leukozyten Antigen (HLA) gehäuft in japanischen AIP Patienten auftritt (Kawa et al. 2002). In einer folgenden Studie aus Korea konnte diese Erkenntnis jedoch nicht bestätigt werden (Park et al. 2008). Ein weiteres Gen, dass in der AIP möglicherweise eine Rolle spielt, ist das T-Lymphozyten assoziierte Antigen 4 (CTLA-4) (Chang et al. 2007). CTLA-4 dient als negativer Regulator der T-Zellfunktion und Störungen im CTLA-4 Gen werden auch mit verschiedenen anderen autoimmunen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Dultz et al. 2009).

Insgesamt bleibt die Pathogenese Gegenstand der Spekulation und weitere Grundlagenforschung ist nötig, um die komplexen immunologischen Mechanismen, die in der Initiation der Erkrankung eine Rolle spielen, zu verstehen.

Die Rolle von Mikrozirkulationsstörungen in der Pathogenese der AIP fand bisher keine Beachtung, obwohl Störungen der Mikrozirkulation in autoimmunen Erkrankungen (Norman et al. 2008) sowie akuten und chronischen Pankreatitiden (Menger et al. 2001; Glawe et al. 2005) ein gut dokumentiertes Phänomen sind. Durch die exzessive Leukozyten-Akkumulation sowie durch die Bildung inflammatorischer Mediatoren über einen langen Zeitraum hinweg könnte es auch bei der humanen AIP zu Störungen der Mikrozirkulation kommen. Die Abnahme der nutritiven Perfusion mit folgender Hypoxie könnte den durch die immunologische Reaktion verursachten Gewebeschaden potenzieren. Auch die Entstehung der in der AIP beobachteten Fibrose könnte durch Mikrozirkulationsstörungen begünstigt werden. Sternzellen werden unter hypoxischen Bedingungen angeregt, vermehrt extrazelluläre Matrix zu bilden (Masamune et al. 2008; Leung 2007). Die in der AIP beobachtete Fibrose könnte somit unter anderem auch Folge einer durch Mikrozirkulationsstörungen verursachten Hypoxie sein. Abbildung 24 stellt daher ein aktuelles mögliches Konzept zur Pathogenese der AIP dar.

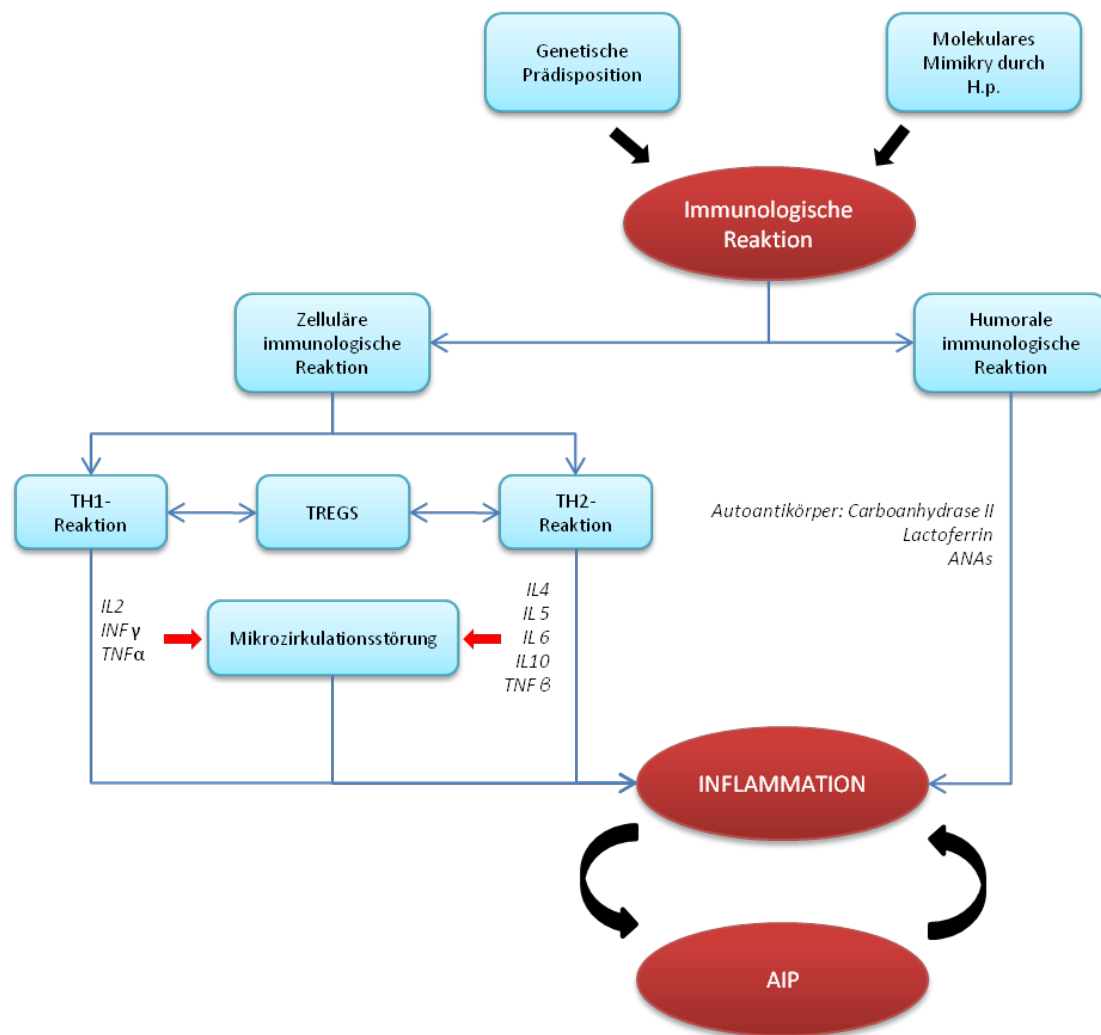


Abbildung 24: Verschiedene Hypothesen zur Pathogenese der AIP wurden geäußert. Als wahrscheinlich gilt, dass das der immunologischen Reaktion zugrundeliegende Antigen im Epithel der Pankreasgänge liegt. Durch eine Kreuzreaktion zwischen der Epithelialen Carboanhydrase II und einem Enzym von *Helicobacter pylori* (H.p.) könnte es zur autoimmunologischen Reaktion kommen. Aber auch verschiedene andere Autoantikörper sind im Krankheitsverlauf nachweisbar. Diskutiert werden auch eine genetische Disposition zur Erkrankung sowie eine Störung der Funktion von regulatorischen T-Zellen. Die durch die T-Helferzellen sezernierten Entzündungsmediatoren führen letztlich zu einer Inflammation im Pankreasparenchym und zu einer Störung der Mikrozirkulation, welche ihrerseits zur Aggravierung der Erkrankung beiträgt.

7.5 KLINISCHE UND WISSENSCHAFTLICHE PERSPEKTIVEN

Obwohl es sich bei der AIP um eine seltene Erkrankung handelt, ist sie in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Dies gilt insbesondere, da die AIP als Differentialdiagnose des Pankreaskarzinoms von klinischer Bedeutung ist. Da die AIP im Gegensatz zum Karzinom keiner chirurgischen Intervention bedarf, sondern durch Steroidgabe therapiert werden kann, ist die richtige Diagnosestellung von zentraler Bedeutung (Law et al. 2009; Sorg et al. 2008).

Zur Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten bedarf es jedoch zunächst weiterer wissenschaftlicher Studien, so dass die der Erkrankung zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen vollständig verstanden werden. Aufgrund der geringen Fallzahlen gestalten sich wissenschaftliche Untersuchungen zu dieser Erkrankung jedoch schwierig. Somit sind gut etablierte und einfach zu reproduzierende Tiermodelle von großer Bedeutung. Insbesondere der Mangel an gut charakterisierten Tiermodellen war bislang jedoch eine der Hauptschwierigkeiten in der tierexperimentellen Arbeit zur AIP (Jaster & Emmrich 2006; Sorg et al. 2008).

Die von uns umfassend untersuchte und charakterisierte MRL/Mp Maus bietet durch die spontan und in ausreichender Inzidenz ausgebildete AIP eine reproduzierbare und valide Untersuchungsgrundlage für weitere Untersuchungen zur AIP.

Im Anschluss an die von uns durchgeführten Untersuchungen zur AIP in der MRL/Mp Maus konnten Fitzner und Mitarbeiter zeigen, dass es durch Immunmodulation mit Interferon Gamma zu einer Aggravierung der AIP in MRL/MP Mäusen kommt (Fitzner et al. 2009). Diese Beobachtung wirft insbesondere die Frage auf, wie sich die beobachteten Mikrozirkulationsstörungen im Falle einer Immunmodulation, aber auch im Falle einer therapeutischen Gabe von Steroiden darstellen.

8. QUELLEN UND LITERATURANGABEN

Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology*. 2002;105:9-19.

Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:469-77.

Abraham SC, Wilentz RE, Yeo CJ, Sohn TA, Cameron JL, Boitnott JK, Hruban RH. Pancreaticoduodenectomy (Whipple resections) in patients without malignancy: are they all "chronic pancreatitis"? *Am J Surg Pathol*. 2003a;27:110-20.

Abraham SC, Leach S, Yeo CJ, Cameron JL, Murakata LA, Boitnott JK, Albores-Saavedra J, Hruban RH. Eosinophilic pancreatitis and increased eosinophils in the pancreas. *Am J Surg Pathol*. 2003b;27:334-42.

Ahmed SA, Wray C, Rilo HL, Choe KA, Gelrud A, Howington JA, Lowy AM, Matthews JB. Chronic pancreatitis: recent advances and ongoing challenges. *Curr Probl Surg*. 2006;43:127-238.

Aho HJ, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions. *Scand J Gastroenterol*. 1980;15:417-24.

Anderson MC, Schoenfeld FB, Iams WB, Suwa M. Circulatory changes in acute pancreatitis. *Surg Clin North Am*. 1967;47:127-40.

Anderson MC, Schiller WR. Microcirculatory dynamics in the normal and inflamed pancreas. *Am J Surg*. 1968;115:118-27.

Apte MV, Wilson JS, McCaughan GW, Korsten MA, Haber PS, Norton ID, Pirola RC. Ethanol-induced alterations in messenger RNA levels correlate with glandular content of pancreatic enzymes. *J Lab Clin Med*. 1995;125:634-40.

Apte MV, Wilson JS. Mechanisms of pancreatic fibrosis. *Dig Dis*. 2004;22:273-9.

Asada M, Nishio A, Uchida K, Kido M, Ueno S, Uza N, Kiriya K, Inoue S, Kitamura H, Ohashi S, Tamaki H, Fukui T, Matsuura M, Kawasaki K, Nishi T, Watanabe N, Nakase H, Chiba T, Okazaki K. Identification of a novel autoantibody against pancreatic secretory trypsin inhibitor in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas*. 2006;33:20-6.

Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1995;15:85-91.

Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:227-35.

Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998;115: 421–432

Baron JL, Reich EP, Visintin I, Janeway CA Jr. The pathogenesis of adoptive murine autoimmune diabetes requires an interaction between alpha 4-integrins and vascular cell adhesion molecule-1. *J Clin Invest*. 1994;93:1700-8.

Bassi D, Kollias N, Fernandez-del Castillo C, Foitzik T, Warshaw AL, Rattner DW. Impairment of pancreatic microcirculation correlates with the severity of acute experimental pancreatitis. *J Am Coll Surg*. 1994;179:257-63.

Bayliss WM, Starling EH. The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol*. 1902;28:325-53.

- Bertry-Coussot L, Lucas B, Danel C, Halbwachs-Mecarelli L, Bach JF, Chatenoud L, Lemarchand P. Long-term reversal of established autoimmunity upon transient blockade of the LFA-1/intercellular adhesion molecule-1 pathway. *J Immunol.* 2002;168:3641-8.
- Bloechle C, Kusterer K, Kuehn RM, Schneider C, Knoefel WT, Izbicki JR. Inhibition of bradykinin B2 receptor preserves microcirculation in experimental pancreatitis in rats. *Am J Physiol.* 1998;274:G42-51.
- Bohlen HG, Gore RW. Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies. *Microvasc Res.* 1976;11:103-110.
- Bonelli M, von Dalwigk K, Savitskaya A, Smolen JS, Scheinecker C. Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:664-71.
- Bonelli M, Smolen JS, Scheinecker C. Treg and lupus. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:i65-66.
- Bourliere M, Barthet M, Berthezene P, Durbec JP, Sarles H. Is tobacco a risk factor for chronic pancreatitis and alcoholic cirrhosis? *Gut.* 1991;32:1392-5.
- Brivet FG, Emilie D, Galanaud P. Pro- and anti-inflammatory cytokines during acute severe pancreatitis: an early and sustained response, although unpredictable of death. Parisian Study Group on Acute Pancreatitis. *Crit Care Med.* 1999;27:749-55.
- Broe PJ, Zuidema GD, Cameron JL. The role of ischemia in acute pancreatitis: studies with an isolated perfused canine pancreas. *Surgery.* 1982;91:377-82.
- Büchler M, Friess H, Uhl W, Beger HG. Clinical relevance of experimental acute pancreatitis. *Eur Surg Res.* 1992;24:85-8. Review.
- Buitrago S, Martin TE, Tetens-Woodring J, Belicha-Villanueva A, Wilding GE. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2008;47:11-7.
- Busnardo AC, DiDio LJ, Tidrick RT, Thomford NR. History of the pancreas. *Am J Surg.* 1983;146:539-50.
- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 1991;67:1033-6.
- Carroll GL, Hartsfield SM. General anesthetic techniques in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1996;12:627-61.
- Ceranowicz P, Dembinski A, Warzecha Z, Dembinski M, Cieszkowski J, Rembisz K, Konturek SJ, Kusnierz-Cabala B, Tomaszewska R, Pawlik WW. Protective and therapeutic effect of heparin in acute pancreatitis. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59:103-25.
- Chang MC, Chang YT, Tien YW, Liang PC, Jan IS, Wei SC, Wong JM. T-cell regulatory gene CTLA-4 polymorphism/haplotype association with autoimmune pancreatitis. *Clin Chem.* 2007;53:1700-5.
- Chari ST, Smyrk TC, Levy MJ, Topazian MD, Takahashi N, Zhang L, Clain JE, Pearson RK, Petersen BT, Vege SS, Farnell MB. Diagnosis of autoimmune pancreatitis: the Mayo Clinic experience. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4:1010-6.
- Chari ST. Current concepts in the treatment of autoimmune pancreatitis. *JOP.* 2007;8:1-3.
- Chen HM, Hwang TL, Chen MF. The effect of gabexate mesilate on pancreatic and hepatic microcirculation in acute experimental pancreatitis in rats. *J Surg Res.* 1996;66:147-53.

- Chen L, Martinez O, Venkataramani P, Lin SX, Prabhakar BS, Chan LS. Correlation of disease evolution with progressive inflammatory cell activation and migration in the IL-4 transgenic mouse model of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol*. 2005;139:189-201.
- Cheung AT, Tomic MM, Chen PC, Miguelino E, Li CS, Devaraj S. Correlation of microvascular abnormalities and endothelial dysfunction in Type-1 Diabetes Mellitus (T1DM): a real-time intravital microscopy study. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009;42:285-95.
- Choi EK, Kim MH, Lee TY, Kwon S, Oh HC, Hwang CY, Seo DW, Lee SS, Lee SK. The sensitivity and specificity of serum immunoglobulin G and immunoglobulin G4 levels in the diagnosis of autoimmune chronic pancreatitis: Korean experience. *Pancreas*. 2007;35:156-61.
- Davidson TS, Longnecker DS, Hickey WF. An experimental model of autoimmune pancreatitis in the rat. *Am J Pathol*. 2005;166:729-36.
- Deng X, Wood PG, Eagon PK, Whitcomb DC. Chronic alcohol-induced alterations in the pancreatic secretory control mechanisms. *Dig Dis Sci*. 2004;49:805-19.
- Deshpande V, Chicano S, Finkelberg D, Selig MK, Mino-Kenudson M, Brugge WR, Colvin RB, Lauwers GY. Autoimmune pancreatitis: a systemic immune complex mediated disease. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:1537-45.
- Ectors N, Maillet B, Aerts R, Geboes K, Donner A, Borchard F, Lankisch P, Stolte M, Lüttges J, Kremer B, Klöppel G. Non-alcoholic duct destructive chronic pancreatitis. *Gut*. 1997;41:263-8.
- Detlefsen S, Sipos B, Zhao J, Drewes AM, Klöppel G. Autoimmune pancreatitis: expression and cellular source of profibrotic cytokines and their receptors. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:986-95.
- Dos Santos AC, Roffê E, Arantes RM, Juliano L, Pesquero JL, Pesquero JB, Bader M, Teixeira MM, Carvalho-Tavares J. Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. *J Neuroinflammation*. 2008;5:49.
- Dultz G, Dittmar M, Kahaly GJ. Genetics of thyroid autoimmunity - update and clinical relevance. *Med Klin (Munich)*. 2009;104:210-9.
- Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286:G769-76.
- Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986;314:1360-8.
- England GC, Clarke KW. Alpha 2 adrenoceptor agonists in the horse--a review. *Br Vet J*. 1996;152:641-57.
- Esposito I, Bergmann F, Penzel R, di Mola FF, Shrikhande S, Büchler MW, Friess H, Otto HF. Oligoclonal T-cell populations in an inflammatory pseudotumor of the pancreas possibly related to autoimmune pancreatitis: an immunohistochemical and molecular analysis. *Virchows Arch*. 2004;444:119-26.
- Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*. 2001;120:682-707.
- Finkelberg DL, Sahani D, Deshpande V, Brugge WR. Autoimmune pancreatitis. *N Engl J Med*. 2006;355:2670-6.
- Fitzner B, Holzhueter SA, Ibrahim S, Nizze H, Jaster R. Interferon-gamma treatment accelerates and aggravates autoimmune pancreatitis in the MRL/Mp-mouse. *Pancreatology*. 2009;9:233-9.

- Foitzik T, Lewandrowski KB, Fernández-del Castillo C, Rattner DW, Klar E, Warshaw AL. Exocrine hyperstimulation but not pancreatic duct obstruction increases the susceptibility to alcohol-related pancreatic injury. *Arch Surg*. 1994;129:1081-5.
- Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor blockade improves fluid sequestration, pancreatic capillary blood flow, and survival in severe experimental pancreatitis. *Ann Surg*. 1998a;228:670-5.
- Foitzik T, Hotz HG, Hot B, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin-1 mediates the alcohol-induced reduction of pancreatic capillary blood flow. *J Gastrointest Surg*. 1998b;2:379-84.
- Foitzik T, Eibl G, Buhr HJ. Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: comparison of delayed therapy with ICAM-1 antibodies and a specific endothelin A receptor antagonist. *J Gastrointest Surg* 2000;4:240-247
- Foitzik T, Eibl G, Hotz B, Hotz H, Kahrau S, Kasten C, Schneider P, Buhr HJ. Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: experimental findings and clinical implications. *Dig Dis Sci*. 2002;47:130-8.
- Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology*. 1999;116:694-701.
- Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet*. 2008;371:143-52.
- Frulloni L, Lunardi C, Simone R, Dolcino M, Scattolini C, Falconi M, Benini L, Vantini I, Corrocher R, Puccetti A. Identification of a novel antibody associated with autoimmune pancreatitis. *N Engl J Med*. 2009;361:2135-42.
- Gaffen SL. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2009;11:365-70.
- Gardner TB, Levy MJ, Takahashi N, Smyrk TC, Chari ST. Misdiagnosis of autoimmune pancreatitis: a caution to clinicians. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:1620-3.
- Ghazale A, Chari ST, Smyrk TC, Levy MJ, Topazian MD, Takahashi N, Clain JE, Pearson RK, Pelaez-Luna M, Petersen BT, Vege SS, Farnell MB. Value of serum IgG4 in the diagnosis of autoimmune pancreatitis and in distinguishing it from pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:1646-53.
- Gierer P, Ibrahim S, Mittlmeier T, Koczan D, Moeller S, Landes J, Gradl G, Vollmar B. Gene expression profile and synovial microcirculation at early stages of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:R868-76.
- Glawe C, Emmrich J, Sparmann G, Vollmar B. In vivo characterization of developing chronic pancreatitis in rats. *Lab Invest*. 2005;85:193-204.
- Gouma DJ, Coelho JC, Schlegel J, Fisher JD, Li YF, Moody FG. Estimation of hepatic blood flow by hydrogen gas clearance. *Surgery*. 1986;99:439-45.
- Guarneri F, Guarneri C, Benvenga S. Helicobacter pylori and autoimmune pancreatitis: role of carbonic anhydrase via molecular mimicry? *J Cell Mol Med*. 2005;9:741-4.
- Haber PS, Wilson JS, Apte MV, Korsten MA, Pirola RC. Chronic ethanol consumption increases the fragility of rat pancreatic zymogen granules. *Gut*. 1994;35:1474-8.
- Haber PS, Apte MV, Applegate TL, Norton ID, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Metabolism of ethanol by rat pancreatic acinar cells. *J Lab Clin Med*. 1998;132:294-302.
- Hackert T, Werner J, Gebhard MM, Klar E. Effects of heparin in experimental models of acute pancreatitis and post-ERCP pancreatitis. *Surgery*. 2004;135:131-8.

- Hamano H, Kawa S, Horiuchi A, Unno H, Furuya N, Akamatsu T, Fukushima M, Nikaido T, Nakayama K, Usuda N, Kiyosawa K. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med*. 2001;344:732-8.
- Hardacre JM, Iacobuzio-Donahue CA, Sohn TA, Abraham SC, Yeo CJ, Lillemoe KD, Choti MA, Campbell KA, Schulick RD, Hruban RH, Cameron JL, Leach SD. Results of pancreaticoduodenectomy for lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis. *Ann Surg*. 2003;237:853-8; discussion 858-9.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6:1123-32.
- Hirota M, Nozawa F, Okabe A, Shibata M, Beppu T, Shimada S, Egami H, Yamaguchi Y, Ikei S, Okajima T, Okamoto K, Ogawa M. Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. *Pancreas*. 2000;21:141-6.
- Hoffman RW, Alspaugh MA, Waggle KS, Durham JB, Walker SE. Sjögren's syndrome in MRL/l and MRL/n mice. *Arthritis Rheum*. 1984;27:157-65.
- Hoffmann TF, Leiderer R, Waldner H, Arbogast S, Messmer K. Ischemia reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats. *Res Exp Med (Berl)*. 1995;195:125-44.
- Horiuchi A, Kawa S, Hamano H, Ochi Y, Kiyosawa K. Sclerosing pancreato-cholangitis responsive to corticosteroid therapy: report of 2 case reports and review. *Gastrointest Endosc*. 2001;53:518-22.
- Horiuchi A, Kawa S, Hamano H, Hayama M, Ota H, Kiyosawa K. ERCP features in 27 patients with autoimmune pancreatitis. *Gastrointest Endosc*. 2002;55:494-9.
- Horobin RW, Rashid F. Interactions of molecular probes with living cells and tissues. Part 1. Some general mechanistic proposals, making use of a simplistic Chinese box model. *Histochemistry*. 1990;94:205-9.
- Hosaka N, Nose M, Kyogoku M, Nagata N, Miyashima S, Good RA, Ikehara S. Thymus transplantation, a critical factor for correction of autoimmune disease in aging MRL/+mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:8558-62.
- Howard JM, Hess W, Traverso W. Johann Georg Wirsüng (1589-1643) and the pancreatic duct: the prosector of Padua, Italy. *J Am Coll Surg*. 1998;187:201-11.
- Jaster R, Emmrich J. Molecular characteristics of autoimmune pancreatitis. *Curr Pharm Des*. 2006;12:3781-3786.
- Kamisawa T, Egawa N, Nakajima H, Tsuruta K, Okamoto A, Kamata N. Clinical difficulties in the differentiation of autoimmune pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:2694-9.
- Kamisawa T, Okamoto A, Funata N. Clinicopathological features of autoimmune pancreatitis in relation to elevation of serum IgG4. *Pancreas*. 2005;31:28-31.
- Kamisawa T, Okamoto A. Autoimmune pancreatitis: proposal of IgG4-related sclerosing disease. *J Gastroenterol*. 2006a;41:613-25.
- Kamisawa T, Nakajima H, Egawa N, Funata N, Tsuruta K, Okamoto A. IgG4-related sclerosing disease incorporating sclerosing pancreatitis, cholangitis, sialadenitis and retroperitoneal fibrosis with lymphadenopathy. *Pancreatol*. 2006b;6:132-7.
- Kamisawa T, Satake K. Clinical management of autoimmune pancreatitis. *Adv Med Sci*. 2007;52:61-5.
- Kamisawa T. Diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42:404-7.

- Kanno H, Nose M, Itoh J, Taniguchi Y, Kyogoku M. Spontaneous development of pancreatitis in the MRL/Mp strain of mice in autoimmune mechanism. *Clin Exp Immunol*. 1992;89:68-73.
- Kawa S, Ota M, Yoshizawa K, Horiuchi A, Hamano H, Ochi Y, Nakayama K, Tokutake Y, Katsuyama Y, Saito S, Hasebe O, Kiyosawa K. HLA DRB10405-DQB10401 haplotype is associated with autoimmune pancreatitis in the Japanese population. *Gastroenterology*. 2002;122:1264-9.
- Kawaguchi K, Koike M, Tsuruta K, Okamoto A, Tabata I, Fujita N. Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis with cholangitis: a variant of primary sclerosing cholangitis extensively involving pancreas. *Hum Pathol*. 1991;22:387-95.
- Keck T, Friebe V, Warshaw AL, Antoniu BA, Waneck G, Benz S, Hopt UT, Fernández-del-Castillo C. Pancreatic proteases in serum induce leukocyte-endothelial adhesion and pancreatic microcirculatory failure. *Pancreatology*. 2005;5:241-50.
- Kerner T, Vollmar B, Menger MD, Waldner H, Messmer K. Determinants of pancreatic microcirculation in acute pancreatitis in rats. *J Surg Res*. 1996;62:165-71.
- Kidd M, Modlin IM. The luminati of Leiden: from Bontius to Boerhaave. *World J Surg*. 1999;23:1307-14.
- Kim KP, Kim MH, Song MH, Lee SS, Seo DW, Lee SK. Autoimmune chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:1605-16.
- Klar E, Endrich B, Messmer K. Microcirculation of the pancreas. A quantitative study of physiology and changes in pancreatitis. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1990;9:85-101.
- Kleeff J, Welsch T, Esposito I, Löhr M, Singer R, Büchler MW, Friess H. Autoimmune pancreatitis--a surgical disease? *Chirurg*. 2006;77:154-65.
- Klöppel G, Petersen F, Lankisch PG. Chronic pancreatitis imitating pancreatic carcinoma. *Gastrointest Endosc*. 1998;48:231.
- Klöppel G, Sipos B, Lüttges J. Spectrum of chronic pancreatitis. On the way to etiological classification. *Pathologe*. 2005a;26:59-66.
- Klöppel G, Lüttges J, Sipos B, Capelli P, Zamboni G. Autoimmune pancreatitis: pathological findings. *JOP*. 2005b;6:97-101.
- Klöppel G, Sipos B, Zamboni G, Kojima M, Morohoshi T. Autoimmune pancreatitis: histo- and immunopathological features. *J Gastroenterol*. 2007;42:28-31.
- Klyscz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H. Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)*. 1997;42:168-75.
- König A, König U, Gress T. Diagnostics and therapy of chronic pancreatitis. *Internist (Berl)*. 2008;49:695-707.
- Koo A. Vagotomy attenuates histamine-induced vasodilation in rat gastric microcirculation. *J Physiol (London)*. 1982;325:23-24P.
- Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. A concept on the role of Helicobacter pylori infection in autoimmune pancreatitis. *J Cell Mol Med*. 2005;9:196-207.
- Krones C, Kasperk R. Chirurgische Therapie der akuten Pankreatitis. *Praxis der Viszeralchirurgie; Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 2006;691-694.
- Kuhn A, Beissert S, Krammer PH. CD4(+)CD25 (+) regulatory T cells in human lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res*. 2009;301:71-81.

- Kuhnle GEH, Leipfinger FH, Goetz AE. Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *J Appl Physiol*. 1993;74:1462-1471.
- Kyogoku T, Manabe T, Tobe T. Role of ischemia in acute pancreatitis. Hemorrhagic shock converts edematous pancreatitis to hemorrhagic pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci*. 1992;37:1409-17.
- Lammer J, Herlinger H, Zalaudek G, Hofler H. Pseudotumorous pancreatitis. *Gastrointest Radiol*. 1985;10:59-67.
- Laposata EA, Lange LG. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science*. 1986;231:497-9.
- Law R, Bronner M, Vogt D, Stevens T. Autoimmune pancreatitis: a mimic of pancreatic cancer. *Cleve Clin J Med*. 2009;76:607-15.
- Leach SD, Gorelick FS, Modlin IM. Acute pancreatitis at its centenary. The contribution of Reginald Fitz. *Ann Surg*. 1990;212:109-13.
- Leung PS. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *J Physiol*. 2007;580:31-7.
- Levy MJ, Reddy RP, Wiersema MJ, Smyrk TC, Clain JE, Harewood GC, Pearson RK, Rajan E, Topazian MD, Yusuf TE, Chari ST, Petersen BT. EUS-guided trucut biopsy in establishing autoimmune pancreatitis as the cause of obstructive jaundice. *Gastrointest Endosc*. 2005;61:467-72.
- Liu X, Nakano I, Yamaguchi H, Ito T, Goto M, Koyanagi S, Kinjoh M, Nawata H. Protective effect of nitric oxide on development of acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci*. 1995a;40:2162-9.
- Liu XH, Kimura T, Ishikawa H, Yamaguchi H, Furukawa M, Nakano I, Kinjoh M, Nawata H. Effect of endothelin-1 on the development of hemorrhagic pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol*. 1995b;30:276-82.
- Lloyd CM, Gonzalo JA, Salant DJ, Just J, Gutierrez-Ramos JC. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency prolongs survival and protects against the development of pulmonary inflammation during murine lupus. *J Clin Invest*. 1997;100:963-71.
- Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity*. 2009;31:438-49.
- Löhr JM, Faissner R, Koczan D, Bewerunge P, Bassi C, Brors B, Eils R, Frulloni L, Funk A, Halangk W, Jesnowski R, Kaderali L, Kleeff J, Krüger B, Lerch MM, Lösel R, Magnani M, Neumaier M, Nittka S, Sahin-Tóth M, Sängler J, Serafini S, Schnölzer M, Thierse HJ, Wandschneider S, Zamboni G, Klöppel G. Autoantibodies against the exocrine pancreas in autoimmune pancreatitis: gene and protein expression profiling and immunoassays identify pancreatic enzymes as a major target of the inflammatory process. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:2060-71.
- Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. *Am J Pathol*. 1975;79:465-80.
- Maloy KJ. The Interleukin-23/Interleukin-17 axis in intestinal inflammation. *J Intern Med*. 2008;263:584-90.
- Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Shimosegawa T. Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:G709-17.
- Matos C, Bali MA, Delhaye M, Devière J. Magnetic resonance imaging in the detection of pancreatitis and pancreatic neoplasms. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006;20:157-78.
- McCuskey RS, Chapman TM. Microscopy of the living pancreas in situ. *Am J Anat*. 1969;126:395-407.

- McCuskey RS, McCuskey PA. In vivo microscopy of the spleen. *Bibl Anat.* 1977;16:121-125.
- Meagher C, Tang Q, Fife BT, Bour-Jordan H, Wu J, Pardoux C, Bi M, Melli K, Bluestone JA. Spontaneous development of a pancreatic exocrine disease in CD28-deficient NOD mice. *J Immunol.* 2008;180:7793-803.
- Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia/reperfusion injury in striated muscle: Significance of "no reflow". *Am J Physiol.* 1992;263:H1892-H1900.
- Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B. Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury. An intravital fluorescence microscopic study in rats. *Dig Dis Sci.* 1996;41:823-30.
- Menger MD, Plusczyk T, Vollmar B. Microcirculatory derangements in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2001;8:187-94.
- Micheels J, Alsbjorn B, Sorensen B. Laser doppler flowmetry. A new non-invasive measurement of microcirculation in intensive care? *Resuscitation.* 1984;12:31-9.
- Miyoshi H, Uchida K, Taniguchi T, Yazumi S, Matsushita M, Takaoka M, Okazaki K. Circulating naïve and CD4+CD25high regulatory T cells in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas.* 2008;36:133-40.
- Mizunuma T, Kawamura S, Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. *J Nutr.* 1984;114:467-71.
- Neild GH, Rodriguez-Justo M, Wall C, Connolly JO. Hyper-IgG4 disease: report and characterisation of a new disease. *BMC Med.* 2006;4:23.
- Norman J, Yang J, Fink G, Carter G, Ku G, Denham W, Livingston D. Severity and mortality of experimental pancreatitis are dependent on interleukin-1 converting enzyme (ICE). *J Interferon Cytokine Res.* 1997;17:113-8.
- Norman MU, Hickey MJ. Mechanisms of lymphocyte migration in autoimmune disease. *Tissue Antigens.* 2005;66:163-72.
- Norman MU, James WG, Hickey MJ. Differential roles of ICAM-1 and VCAM-1 in leukocyte-endothelial cell interactions in skin and brain of MRL/fas^{pr} mice. *J Leukoc Biol.* 2008;84:68-76.
- Ohara H, Nakazawa T, Sano H, Ando T, Okamoto T, Takada H, Hayashi K, Kitajima Y, Nakao H, Joh T. Systemic extrapancreatic lesions associated with autoimmune pancreatitis. *Pancreas.* 2005;31:232-7.
- Ohmuraya M, Hirota M, Araki K, Baba H, Yamamura K. Enhanced trypsin activity in pancreatic acinar cells deficient for serine protease inhibitor kazal type 3. *Pancreas.* 2006;33:104-6.
- Oi I. ERCP imaging. *Pancreas.* 1998;16:402-7.
- Okazaki K, Uchida K, Ohana M, Nakase H, Uose S, Inai M, Matsushima Y, Katamura K, Ohmori K, Chiba T. Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and a Th1/Th2-type cellular immune response. *Gastroenterology.* 2000;118:573-81.
- Okazaki K, Chiba T. Autoimmune related pancreatitis. *Gut.* 2002 Jul;51:1-4.
- Okazaki K, Kawa S, Kamisawa T, Naruse S, Tanaka S, Nishimori I, Ohara H, Ito T, Kiriya S, Inui K, Shimosegawa T, Koizumi M, Suda K, Shiratori K, Yamaguchi K, Yamaguchi T, Sugiyama M, Otsuki M; Research Committee of Intractable Diseases of the Pancreas. Clinical diagnostic criteria of autoimmune pancreatitis: revised proposal. *J Gastroenterol.* 2006;41:626-31.

- Okazaki K, Uchida K, Matsushita M, Takaoka M. to diagnose autoimmune pancreatitis by the revised Japanese clinical criteria. *J Gastroenterol.* 2007;42:32-8.
- Okazaki K, Uchida K, Fukui T. Recent advances in autoimmune pancreatitis: concept, diagnosis, and pathogenesis. *J Gastroenterol.* 2008;43:409-18.
- Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest.* 2007;117:50-9.
- O'Reilly DA, Kingsnorth AN. A brief history of pancreatitis. *J R Soc Med.* 2001;94:130-2.
- Paal P, Herff H, Mitterlechner T, von Goedecke A, Brugger H, Lindner KH, Wenzel V. Anaesthesia in prehospital emergencies and in the emergency room. *Resuscitation.* 2010;81:148-54.
- Pannala R, Kidd M, Modlin IM. Acute pancreatitis: a historical perspective. *Pancreas.* 2009;38:355-66.
- Park do H, Kim MH, Oh HB, Kwon OJ, Choi YJ, Lee SS, Lee TY, Seo DW, Lee SK. Substitution of aspartic acid at position 57 of the DQbeta1 affects relapse of autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology* 2008;134:440–6.
- Park DH, Kim MH, Chari ST. Recent advances in autoimmune pancreatitis. *Gut.* 2009;58:1680-9.
- Plumb DC. Veterinary Drug Handbook. *PharmaVet Publishing, White Bear Lake (USA)* 1999:853
- Plusczyk T, Bersal B, Westermann S, Menger M, Feifel G. ET-1 induces pancreatitis-like microvascular deterioration and acinar cell injury. *J Surg Res.* 1999;85:301-10.
- Paradowska-Gorycka A, Wojtecka-Lukasik E, Trefler J, Wojciechowska B, Lacki JK, Maslinski S. Association between IL-17F gene polymorphisms and susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis (RA). *Scand J Immunol.* 2010;72:134-41.
- Rawstron AC. Immunophenotyping of plasma cells. *Curr Protoc Cytom.* 2006;6:6.23.
- Pearson RK, Longnecker DS, Chari ST, Smyrk TC, Okazaki K, Frulloni L, Cavallini G. Controversies in clinical pancreatology: autoimmune pancreatitis: does it exist? *Pancreas.* 2003;27:1-13.
- Platts-Mills T, Vaughan J, Squillace S, Woodfolk J, Sporik R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet.* 2001;357:752-6.
- Plusczyk T, Bersal B, Menger MD, Feifel G. Differential effects of ET-1, ET-2, and ET-3 on pancreatic microcirculation, tissue integrity, and inflammation. *Dig Dis Sci.* 2001;46:1343-51.
- Poch B, Gansauge F, Rau B, Wittel U, Gansauge S, Nüssler AK, Schoenberg M, Beger HG. The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation. *FEBS Lett.* 1999;461:268-72.
- Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:3730-4.
- Reich DL, Silvay G. Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Can J Anaesth.* 1989;36:186-97.
- Sahani DV, Kalva SP, Farrell J, Maher MM, Saini S, Mueller PR, Lauwers GY, Fernandez CD, Warshaw AL, Simeone JF. Autoimmune pancreatitis: imaging features. *Radiology.* 2004;233:345-52.
- Sahin-Tóth M, Tóth M Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;278:286-9.

- Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, Hoerauf A. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol.* 2005;174:4718-26.
- Sarles H, Sarles JC, Muratore R, Guien C. Chronic inflammatory sclerosis of the pancreas--an autonomous pancreatic disease? *Am J Dig Dis.* 1961;6:688-98.
- Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, Hoerauf A. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol.* 2005;174:4718-26.
- Schiller WR, Anderson MC. Microcirculation of the normal and inflamed canine pancreas. *Ann Surg.* 1975;181:466-70.
- Schneider A, Löhr JM. Autoimmune pancreatitis. *Internist (Berl).* 2009;50:318-30.
- Shi HN, Walker WA. T helper cell subclasses and clinical disease states. *Curr Opin Gastroenterol.* 2002;18:711-6.
- Shibuya K, Sunamura M, Yamauchi J, Takeda K, Kobari M, Matsuno S. Analysis of the derangement of the pancreatic microcirculation in a rat caerulein pancreatitis model using an intravital microscope system. *Tohoku J Exp Med.* 1996;180:173-86.
- Sorg H, Lorch B, Jaster R, Fitzner B, Ibrahim S, Holzhüeter SA, Nizze H, Vollmar B. Early rise in inflammation and microcirculatory disorder determine the development of autoimmune pancreatitis in the MRL/Mp-mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295:G1274-80.
- Sorg H, Schulz T, Krueger C, Vollmar B. Consequences of surgical stress on the kinetics of skin wound healing: partial hepatectomy delays and functionally alters dermal repair. *Wound Repair Regen.* 2009;17:367-77.
- Sparmann G, Jäschke A, Loehr M, Liebe S, Emmrich J. Tissue homogenization as a key step in extracting RNA from human and rat pancreatic tissue. *Biotechniques.* 1997;22:408-10, 412.
- Steinberg W, Tenner S. Acute pancreatitis. *N Engl J Med.* 1994;330:1198-210.
- Steinhausen M, Zimmerhackl B, Thederan H, Dussel R, Parekh N, Eßlinger H-U, von Hagens G, Komitowski D, Dallenbach FD. Intraglomerular microcirculation: Measurements of single glomerular loop flow in rats. *Kidney Int.* 1981;20:230-239.
- Sutton R. Autoimmune pancreatitis--also a Western disease. *Gut.* 2005;54:581-3.
- Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev.* 2008;223:87-113.
- Toomey DP, Swan N, Torreggiani W, Conlon KC. Autoimmune pancreatitis. *Br J Surg.* 2007;94:1067-74. Review.
- Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R; Working Party of the Program Committee of the Bangkok World Congress of Gastroenterology 2002. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17:15-39.
- Tsubata R, Tsubata T, Hiai H, Shinkura R, Matsumura R, Sumida T, Miyawaki S, Ishida H, Kumagai S, Nakao K, Honjo T. Autoimmune disease of exocrine organs in immunodeficient alymphoplasia mice: a spontaneous model for Sjögren's syndrome. *Eur J Immunol.* 1996;26:2742-8.
- Uchida K, Okazaki K, Konishi Y, Ohana M, Takakuwa H, Hajiro K, Chiba T. Clinical analysis of autoimmune-related pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:2788-94.
- Vallance BA, Hewlett BR, Snider DP, Collins SM. T cell-mediated exocrine pancreatic damage in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Gastroenterology.* 1998;115:978-87.

- Veihelmann A, Harris AG, Krombach F, Schütze E, Refior HJ, Messmer K. In vivo assessment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse antigen-induced arthritis. *Microcirculation*. 1999;6:281-90.
- Villringer A, Haberl RL, Dirnagl U, Anneser F, Verst M, Einhaupl KM. Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo. *Brain Res*. 1989;504:159-160.
- Vollmar B, Waldner H, Schmand J, Conzen PF, Goetz AE, Habazettl H, Schweiberer L, Brendel W. Oleic acid induced pancreatitis in pigs. *Surg Res*. 1991;50:196-204.
- Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K. Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg*. 1992;75:421-30.
- Vollmar B, Preissler G, Menger MD. Hemorrhagic hypotension induces arteriolar vasomotion and intermittent capillary perfusion in rat pancreas. *Am J Physiol*. 1994;267:1936-40.
- Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K. Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart. *Anesth Analg*. 1995;80:249-255.
- von Dobschuetz E, Hoffmann T, Messmer K. Inhibition of neutrophil proteinases by recombinant serpin Lex032 reduces capillary no-reflow in ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;290:782-8.
- Walker NI. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am J Pathol*. 1987;126:439-51.
- Warshaw AL, O'Hara PJ. Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. *Ann Surg*. 1978;188:197-201.
- Weber A, Friess H, Sill U, Büchler M. The closed duodenal loop technique. *Eur Surg Res*. 1992;24:24-8. Review.
- Weber SM, Cubukcu-Dimopulo O, Palesty JA, Suriawinata A, Klimstra D, Brennan MF, Conlon K. J Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis: inflammatory mimic of pancreatic carcinoma. *Gastrointest Surg*. 2003;7:129-37.
- Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*. 1996;14:141-5.
- Witt H, Luck W, Becker M, Böhmig M, Kage A, Truninger K, Ammann RW, O'Reilly D, Kingsnorth A, Schulz HU, Halangk W, Kielstein V, Knoefel WT, Teich N, Keim V. Mutation in the SPINK1 trypsin inhibitor gene, alcohol use, and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2001;285:2716-7.
- Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*. 2007;132:1557-73.
- Wittchen ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci*. 2009;14:2522-45.
- Woeste G, Wullstein C, Meyer S, Usadel KH, Hopt UT, Bechstein WO, von Dobschuetz E. Octreotide attenuates impaired microcirculation in postischemic pancreatitis when administered before induction of ischemia. *Transplantation*. 2008;86:961-7.
- Yan B, Ye S, Chen G, Kuang M, Shen N, Chen S. Dysfunctional CD4+, CD25+ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells. *Arthritis Rheum*. 2008;58:801-12.

Yang XD, Karin N, Tisch R, Steinman L, McDevitt HO. Inhibition of insulinitis and prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by blocking L-selectin and very late antigen 4 adhesion receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:10494-8.

Young W. H₂ clearance measurement of blood flow: a review of technique and polarographic principles. *Stroke*. 1980;11:552-64.

Zamboni G, Lüttges J, Capelli P, Frulloni L, Cavallini G, Pederzoli P, Leins A, Longnecker D, Klöppel G. Histopathological features of diagnostic and clinical relevance in autoimmune pancreatitis: a study on 53 resection specimens and 9 biopsy specimens. *Virchows Arch*. 2004;445:552-63.

Zandieh I, Byrne MF. Autoimmune pancreatitis: a review. *World J Gastroenterol*. 2007;13:6327-32.

Zen Y, Fujii T, Harada K, Kawano M, Yamada K, Takahira M, Nakanuma Y. Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis. *Hepatology*. 2007;45:1538-46.

Zhang L, Notohara K, Levy MJ, Chari ST, Smyrk TC. IgG4-positive plasma cell infiltration in the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Mod Pathol*. 2007;20:23-8.

Zhang XP, Li ZJ, Zhang J. Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2009;8:351-7.

I DANKSAGUNG

An dieser Stelle ist es mir ein großes Bedürfnis all denjenigen sehr herzlich zu danken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock arbeiten zu dürfen. Durch ihre verlässliche Unterstützung und lehrreiche Kritik trug sie entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei. Insbesondere die Unterstützung in der schwierigen Anfangsphase des Projekts hat mich beeindruckt, und mir gezeigt, dass die Entscheidung meine Dissertation am Institut für Experimentelle Chirurgie zu beginnen, die richtige war. Auch die Möglichkeit meine wissenschaftliche Arbeit zu publizieren und auf den Viszeralchirurgischen Tagen in Bonn vorstellen zu dürfen, war eine besondere und wertvolle Erfahrung.

Des Weiteren gilt mein außerordentlicher Dank Herrn Dr. med. Heiko Sorg, dessen Erfahrung, Unterstützung und Einsatz ein entscheidender Baustein im Gelingen dieser Arbeit war. Die Unterstützung bei den wissenschaftlichen Experimenten, beim Erstellen der Publikation und vor allem bei der Fertigstellung der Dissertation war exzellent. Die uneingeschränkte Unterstützung sowohl fachlicherseits als auch menschlicherseits war Gold wert und wird mir Vorbild sein.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Jaster für die Mitarbeit in unserem Projekt und für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen danken. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Nizze und seiner Mitarbeiterin Frau Dr. med. Holzhüter für die Durchführung der histologischen Untersuchungen an seinem Institut.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, ohne deren Einsatz und Unterstützung eine solche Arbeit überhaupt nicht möglich gewesen wäre. Ein großes Dankeschön geht an Berit Blendow, Doris Butzlaff, Dorothea Frenz, Anja Gellert, Maren Nerowski, Claudia Vergien und Dr. rer. nat. Christian Eipel für die unermüdliche, unkomplizierte und stets freundliche Hilfe. Kathrin Sievert-Küchenmeister, Karin Gerber und Reinhard Schwärmer danke ich sehr für die Aufzucht und Betreuung der für diese Arbeit notwendigen Tiere. Mein Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden durch deren Unterstützung vieles leichter wurde.

Zum Schluss möchte ich meinen lieben Eltern von Herzen danken, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben und mir so die Tür zu einem wunderbaren Beruf geöffnet haben. Dank gilt auch meiner Schwester, meiner Tante Iris Beißwanger und all denen, die mich in den vergangenen Jahren unterstützt haben.

Zu guter letzt gilt mein besonderer Dank meiner lieben Frauke, die durch ihre Unterstützung einen ganz wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat.

II THESEN ZUR DISSERTATION

1. Seit einigen Jahren wird die Autoimmunpankreatitis als neuartige eigenständige Entität der chronischen Pankreatitis angesehen. Pathogenese und Pathophysiologie dieses seltenen Krankheitsbildes sind bislang weitgehend unbekannt.
2. MRL/Mp-Mäuse entwickeln aufgrund ihres genetischen Hintergrundes spontan neben verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen auch eine Pankreatitis autoimmuner Genese.
3. Obwohl mikrozirkulatorische Untersuchungen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis verschiedener Pankreatitiden leisten konnten, gab es bislang keine Untersuchungen zur Mikrozirkulation in der AIP. Untersucht wurde daher, ob die AIP mit Mikrozirkulationsstörungen einhergeht.
4. Um die Pathogenese, den Zeitpunkt des Krankheitsbeginns und den Krankheitsverlauf einer möglichen AIP in der MRL/Mp-Maus abzubilden, wurden die Tiere in vier verschiedene Altersgruppen eingeteilt. Allen Tieren wurde bis zum Erreichen des für die Untersuchung erforderlichen Alters repetitiv Blut entnommen. Zum Untersuchungszeitpunkt erfolgte eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Nach Abschluss der *in vivo* Experimente erfolgte die Entnahme von Blut sowie die Pankreatektomie für die *ex vivo* durchgeführten histologischen, molekularbiologischen und serologischen Untersuchungen.
5. Die Analyse der Intravitalmikroskopie ergab eine alters- und geschlechtsabhängige Zunahme der Inflammation im Pankreasparenchym der MRL/Mp-Maus.
6. In weiblichen Tieren kam es zu einer signifikanten intrapankreatischen Leukozyten-Akkumulation. Der Grad der Inflammation in männlichen Tieren war hingegen signifikant schwächer und nicht altersabhängig.

7. Für Tiere, bei denen eine AIP diagnostiziert wurde, konnte eine Störung der mikrovaskulären Perfusion des Pankreasparenchyms festgestellt werden. Für diese Tiere ergab sich in der offline Analyse der *in vivo* Versuche eine verringerte Blutzellfließgeschwindigkeit und eine Abnahme der funktionellen kapillaren Dichte.
8. Die histologische Untersuchung der Schnittpräparate zeigte in allen Tieren der jüngsten Gruppe ein vollständig intaktes Pankreasparenchym. Bei keinem der Tiere konnte eine AIP diagnostiziert werden. In weiblichen Tieren der ältesten Gruppe zeigte sich hingegen eine massenhafte leukozytäre Infiltration, eine Rarefizierung und fettige Degeneration des Pankreasparenchyms.
9. Insgesamt konnte eine signifikante Korrelation zwischen der *in vivo* festgestellten Inflammation und dem *ex vivo* diagnostizierten histopathologischen Score aufgezeigt werden, wobei die Inflammation der Parenchymschädigung, analog zu anderen autoimmunen Erkrankungen, vorausgeht.
10. In weiblichen Tieren der ältesten Gruppe konnten immunhistologisch signifikant mehr Entzündungszellen als in männlichen Tieren derselben Altersgruppe nachgewiesen werden. Molekularbiologisch zeigten diese Tiere eine Hochregulation der Gene pro-inflammatorischer Proteine und im Serum konnten die höchsten Titer für Antinukleäre Antikörper aller untersuchten Tiere nachgewiesen werden.
11. Die durch die immunologische Reaktion bedingten Störungen der nutritiven Perfusion des Pankreas können zusätzlich zum autoimmun bedingten Gewebeschaden eine Schädigung des Pankreasparenchyms hervorrufen.
12. Die MRL/Mp stellt ein vielversprechendes Tiermodell zur weiteren Charakterisierung der AIP dar. Weitere Studien konnten bereits zeigen, dass es durch eine Immunmodulation zur Aggravierung des Krankheitsbildes kommt.

III EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, 15.11.2011
Benjamin Lorch